

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Karel Koubský

Reaktivita plicních cév na hypoxii

Senzitivita cévních hladkých svalových buněk k vápníku

Reactivity of pulmonary vessels to hypoxia

Calcium sensitivity of vascular smooth muscle cells

Dizertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Jan Herget, DrSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 30. 4. 2015

MUDr. Karel Koubský

Podpis

Identifikační záznam:

KOUBSKÝ, Karel. *Reaktivita plicních cév na hypoxii. [Reactivity of pulmonary vessels to hypoxia]*. Praha, 2015. 67 stran, 2 přílohy. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav fyziologie 2. LF UK. Školitel: Herget, Jan.

OBSAH

Úvod	1
Cíle a hypotézy	19
Materiál a metody	23
Výsledky	33
Diskuse	43
Závěr	53
Abstrakt	54
Literatura	58
Přílohy	67

1. ÚVOD

Hypoxická plicní vazokonstrikce

Hypoxická plicní vazokonstrikce je fyziologický mechanismus, který slouží k optimalizaci okysličení krve v plicích. Plícemi protéká celý srdeční výdej a distribuce průtoku může probíhat tedy jen v rámci různých oblastí plic. Pro dobrou oxygenaci krve je nutné, aby do dobře ventilovaných oblastí teklo dostatečné množství krve a naopak aby průtok v hůře ventilovaných oblastech byl omezen. Regulace regionálního průtoku v plicích probíhá pomocí vazokonstrikce plicních cév, která je vyvolána přímo nedostatkem kyslíku, tedy hypoxií. Tato hypoxická plicní vazokonstrikce (HPV) omezuje průtok v alveolech s nízkým parciálním tlakem kyslíku (špatně ventilovaných), aby byl zachován vyšší průtok do dobře ventilovaných alveolů. Tím zachovává správný poměr ventilace/perfúze a zajišťuje optimální okysličení krve.

Při stavech spojených s celkovou hypoxií (např. respirační onemocnění nebo pobyt ve vysoké nadmořské výšce) mechanismus HPV způsobí povšechnou vazokonstrikci v plicích a následně vzestup tlaku v plicnici. Dlouhodobě trvající hypoxie může kombinací dlouhodobé vazokonstrikce plicních cév a jejich remodelace způsobit vznik hypoxické plicní hypertenze.

Hypoxická plicní vazokonstrikce je specifická vlastnost plicních cév a je spouštěna přímo hypoxickým stimulem (Euler von a Liljestrand, 1946). Primárním místem HPV je hladká svalová buňka ve stěně plicních cév – bylo prokázáno, že sama o sobě reaguje na hypoxii kontrakcí (Madden et al., 1992). Celý mechanismus HPV je však velmi komplexní a ovlivněn mnoha faktory. Významná je zejména role endotelu, ale na modulaci HPV se podílí i další humorální i nervové faktory. Nedávno vydaný obsáhlý přehledný článek (Sylvester et al., 2012) se věnuje mechanismům, které se uplatňují při HPV, do nejmenších podobností.

Depolarizace membrány při HPV

Hypoxie způsobuje v hladkých svalových buňkách plicních cév depolarizaci membrány, vznik akčního potenciálu a následnou kontrakci (Harder et al., 1985; Madden et al., 1985). Depolarizace může vznikat kombinací několika mechanismů – inhibicí efluxu K^+ draslíkovými kanály, aktivací influxu kationtů neselektivními kationtovými kanály a aktivací efluxu Cl^- chloridovými kanály.

Bylo prokázáno, že hypoxie inhibuje několik typů napěťově řízených draslíkových kanálů (Gelband a Gelband, 1997; Hogg et al., 2002; Smirnov et al., 2002). Z dalších typů draslíkových kanálů hypoxie inhibuje kanály dvojporového (twin-pore) typu (Olschewski et al., 2006). Sodíkové či neselektivní kationtové kanály a chloridové kanály se při HPV také mohou uplatňovat, ale jejich přesná role není jasná.

Přesná sestava kanálů reagujících na hypoxii se může lišit v závislosti na lokalizaci v plicním cévním řečišti a dalších faktorech. Draslíkové proudy přes membránu se liší u proximálních a distálních plicních cév (Smirnov et al., 2002) a mohou být různé dokonce i u buněk ze stejné cévy (Platoshyn et al., 2007). Je také zajímavé, že citlivost určitých kanálů na hypoxii není dána pouze strukturou proteinu kanálu, ale také dalšími faktory buněčného prostředí. Stejný kanál exprimovaný v plicní cévní hladké svalové buňce tak reaguje na hypoxii, ale stejný kanál v hladké svalové buňce ze systémového řečiště nikoli (Platoshyn et al., 2006).

Hypoxie způsobuje depolarizaci buněčné membrány, ale dosud není jasné, nakolik tato depolarizace přímo přispívá k vyvolání HPV. Depolarizace aktivuje napěťově řízené vápníkové kanály v buněčné membráně (voltage-operated calcium channels, VOCC). Kontrakce samotná závisí na celkovém influxu Ca^{2+} . K tomu může docházet nejen z extracelulárního prostředí, ale také intracelulárních zásob. Uplatňovat se může více druhů vápníkových kanálů.

Role vápníku při hypoxické plicní vazokonstrikci

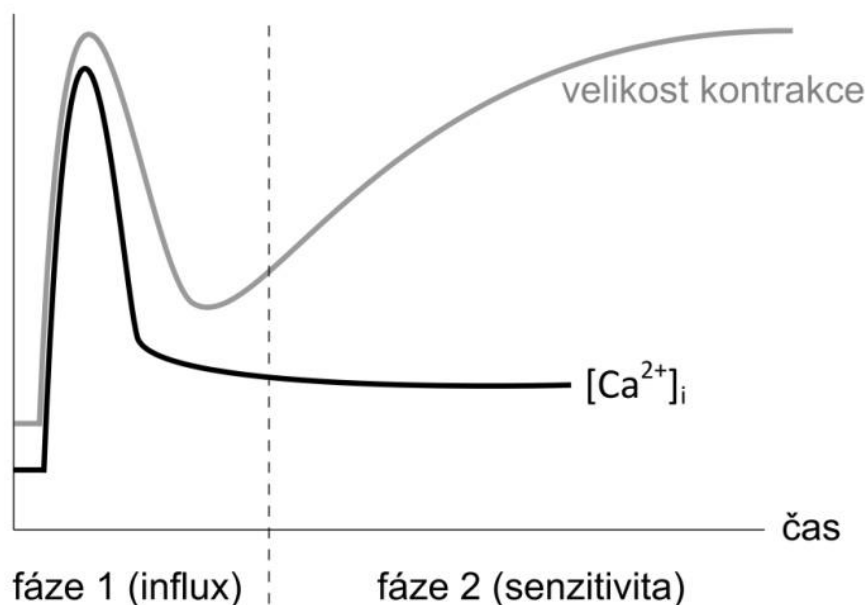
Kontrakce hladké svalové buňky obecně je zprostředkována zvýšením intracelulární koncentrace vápenatých kationtů ($[Ca^{2+}]_i$). Zatímco in vivo působí akutní hypoxie spíše monofázické zvýšení tlaku v plicnici, u izolovaných plicních cév je průběh typicky bifázický (Leach et al., 1994) (Obr. 1.1). První fáze představuje rychlou vazokonstrikci, která dosahuje vrcholu do 10 minut a trvá asi 10 – 15 minut. Druhá fáze nastupuje pomaleji a trvá, dokud je hypoxie přítomna. Obě tyto fáze se vyznačují zvýšením $[Ca^{2+}]_i$, ale jsou zprostředkovány různými mechanismy.

V první fázi HPV je zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ úměrné snížení pO_2 . Tato reakce na hypoxii je rychlá a je charakterizována prudkým vzestupem $[Ca^{2+}]_i$, což způsobí rychlou vazokonstrikci. Tyto změny v $[Ca^{2+}]_i$ spuštěné hypoxií jsou charakteristické pouze pro plicní cévy a jsou více vyjádřeny v distálních plicních artériích než v proximálních. V některých studiích bylo zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ způsobené hypoxií srovnatelné se zvýšením způsobeným jinými agonisty (Zhang et al., 1997), zatímco v jiných bylo menší (Archer et al., 1998).

V druhé fázi následuje postupné snížení $[Ca^{2+}]_i$ a ustálení na určité hodnotě (plató), která je nicméně stále vyšší než normoxická klidová hodnota (Robertson et al., 1995). Pokračování vazokonstrikce během této druhé fáze je zprostředkováno zvýšením citlivosti (senzitivity) k Ca^{2+} .

Zdroj influxu Ca^{2+} během obou fází je rozdílný. První fáze je závislá na mobilizaci Ca^{2+} z intracelulárních zásob. V tomto procesu hrají významnou roli ryanodinové receptory na sarkoplazmatickém retikulu (RyR), které umožňují uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula do cytoplazmy. Je možné, že se na tomto procesu podílí i inositol-trisfosfátové receptory (IP3R). Druhá fáze je zprostředkována influxem Ca^{2+} z extracelulárního prostředí (Robertson et al., 2000b). Zde se uplatňují vápníkové kanály v buněčné membráně, které

mohou být řízené napětím (voltage-operated calcium channels, VOCC) nebo deplecí intracelulárních zásob vápníku v sarkoplazmatickém retikulu (store-operated calcium channels, SOCC).



Obr. 1.1 – Dvě fáze hypoxické plicní vazokonstrikce. $[Ca^{2+}]_i$ – intracelulární koncentrace Ca^{2+} .

Homeostáza vápníku v cévní hladké svalové buňce

Změny v $[Ca^{2+}]_i$ jsou určeny rovnováhou pohybu Ca^{2+} do cytosolu a ven z cytosolu. Zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ při hypoxii tedy může být dáno kombinací těchto procesů: 1) zvýšení influxu Ca^{2+} z intracelulárních zásob, zejména ze sarkoplazmatického retikula, 2) zvýšení influxu Ca^{2+} z extracelulárního prostředí iontovými kanály v plazmatické membráně a eventuálně také prostřednictvím zpětného chodu Na/Ca výměníků, 3) snížením přesunu Ca^{2+} z cytosolu do zásobních organel a 4) snížením efluxu Ca^{2+} ven z buňky Ca-ATPázou a Na/Ca výměníky v buněčné membráně. Konečné změny v $[Ca^{2+}]_i$ jsou výsledkem komplexní interakce těchto procesů.

Závislost HPV na extracelulárním Ca^{2+} byla ukázána v pokusech, kde byly ionty Ca^{2+} z extracelulárního prostředí odstraněny. U izolovaných hladkých svalových buněk z plicních cév neměla absence Ca^{2+} v extracelulárním prostředí vliv na první rychlou fázi HPV, ale zrušila druhou setrvalejší fázi (Salvaterra a Goldman, 1993). Tyto výsledky nasvědčují tomu, že první fáze je závislá na mobilizaci Ca^{2+} z intracelulárních zásob, zatímco druhá je závislá na influxu Ca^{2+} z extracelulárního prostředí. Pokusy na izolovaných plicních cévách a izolovaných perfundovaných plicích tento výsledek potvrzují (Robertson et al., 2000b; Weigand et al., 2005).

Uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula probíhá dvěma základními typy kanálů, ryanodinovými (RyR) a inositol-trisfosfátovými receptory (IP3R). Hlavním faktorem řídícím otevírání obou těchto skupin kanálů je samotné Ca^{2+} , které působí stimulačně v nižších koncentracích a inhibičně v koncentracích vyšších (Berridge et al., 2000). Aktivace IP3R vápníkem je navíc facilitována inositol-trisfosfátem (IP3), který je produkován fosfolipázou C (PLC) v reakci na vazbu agonisty na G protein nebo receptor spřažený s tyrosinkinázou.

Významná role RyR na uvolnění Ca^{2+} z intracelulárních zásob při HPV byla potvrzena řadou studií. Experimentálně je možné RyR poměrně jednoduše zablokovat ryanodinem. Tato blokáda inhibovala velikost HPV v izolovaných hladkých svalových buňkách a plicních cévách (Gelband a Gelband, 1997) i v izolovaných perfundovaných plicích (Morio a McMurtry, 2002). U IP3R nebylo na rozdíl od RyR prokázáno, že se na HPV přímo podílí. Jejich role však nebyla ani vyloučena. Pro HPV není nutná aktivace receptorů spřažených s G proteiny nebo tyrosinkinázou, nicméně produkce IP3 může být spuštěna endogenními agonisty. Stejně tak nemůže jako nezávislost na IP3R interpretován fakt, že vyčerpání intracelulárních zásob po předchozí aktivaci RyR zablokuje HPV. Oba tyto receptory mohou aktivovat stejné zásobní organelly a aktivace IP3R může předcházet aktivaci RyR, která by

poté proběhla pomocí uvolněného Ca^{2+} . Je možné, že IP3R se na mechanismu HPV také podílí, jasné důkazy však nemáme k dispozici.

V cévní hladké svalové buňce mohou RyR a IP3R ovládat stejné nebo oddělené intracelulární zásobní organely. Výsledky nasvědčují tomu, že zatímco v distálních rezistenčních cévách RyR a IP3R řídí stejnou zásobu Ca^{2+} , v proximálních cévách jsou zásoby ovládané jednotlivými typy receptorů oddělené (Urena et al., 1996). RyR a IP3R také mobilizovaly odlišné zásoby Ca^{2+} v čerstvě izolovaných plicních cévních buňkách, ale společné zásoby ve stejných buňkách, pokud byly kultivovány (Ng et al., 2008). V plicních cévách se tedy výskyt jednotlivých receptorů na sarkoplazmatickém retikulu může lišit v závislosti na velikosti cév a buněčné kultuře.

Z cytosolu pumpuje Ca^{2+} zpět do sarkoplazmatického retikula Ca^{2+} ATPáza zvaná SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase). Zablokování SERCA způsobí bifázický vzestup $[\text{Ca}^{2+}]_i$ podobný jako při hypoxii (Salvatera a Goldman, 1993) a navíc zabrání následnému zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hypoxií. Tyto a další výsledky (Gelband a Gelband, 1997) nasvědčují tomu, že by hypoxie mohla působit první rychlou fází vazokonstrikce prostřednictvím inhibice SERCA. Není však jasné, jestli tento mechanismus je opravdu důležitý in vivo, protože inhibitory SERCA neměly vliv na bazální tonus nebo HPV v izolovaných cévách (Jabr et al., 1997) ani izolovaných plicích (Morio a McMurtry, 2002).

Vápníkové kanály

Napětově řízené vápníkové kanály (voltage-operated calcium channels, VOCC) se vyskytují v buněčné membráně ve dvou typech – T (tranzientní) a L (dlouhodobé, long-lasting). Role VOCC typu T u HPV není jasná zejména proto, že nemáme k dispozici jejich selektivního antagonistu. VOCC typu L naproti tomu mohou být selektivně zablokovány několika látkami, např. dihydropyridiny. Významná role VOCC typu L na influxu vápníku při HPV byla

potvrzena řadou studií. Antagonisté těchto kanálů v izolovaných hladkých svalových buňkách plicních cév blokují nebo snižují vzestup $[Ca^{2+}]_i$ způsobený hypoxií (Cornfield et al., 1994; Urena et al., 1996) a naopak jejich aktivátor BAY K 8644 vzestup $[Ca^{2+}]_i$ při hypoxii potencuje (Cornfield et al., 1994). Výsledky z pokusů na izolovaných plicních cévách (Leach et al., 1994; Savineau et al., 1995), izolovaných plicích (McMurtry et al., 1976; Weigand et al., 2005) i živých zvířatech (Stanbrook et al., 1984) jsou obdobné.

Otevření vápníkových kanálů může být také regulováno deplecí zásob Ca^{2+} v sarkoplazmatickém retikulu (store-operated calcium channels, SOCC) nebo navázáním ligandu (receptor-operated calcium channels, ROCC). SOCC jsou aktivovány poklesem koncentrace Ca^{2+} v sarkoplazmatickém retikulu, který může být daný aktivací RyR nebo IP3R v kombinaci s inhibicí SERCA. Otevření SOCC v buněčné membráně způsobí influx Ca^{2+} do cytoplazmy. Tento mechanismus je označován jako store-operated calcium entry (SOCE). ROCC mohou být aktivovány přímo navázáním agonisty (iontový kanál je současně receptorem) nebo navázáním druhých posílů. SOCC a ROCC jsou někdy souhrnně označovány jako neselektivní kationtové kanály (non-selective cation channels, NSCC), protože mohou být průchodné pro Ca^{2+} , Na^+ i další kationty. Influx kationtů může způsobovat depolarizaci membrány a následnou aktivaci VOCC.

Hypoxie způsobuje influx Ca^{2+} i při zablokování VOCC a tento influx může být zrušen zablokováním SOCE (Wang et al., 2005). Tyto a další výsledky (Weigand et al., 2005) nasvědčují tomu, že při HPV je nezbytný influx Ca^{2+} prostřednictvím SOCC i VOCC. Přesný mechanismus přenosu signálu od poklesu koncentrace Ca^{2+} v sarkoplazmatickém retikulu k otevření SOCC však není objasněn.

Na/Ca výměníky v buněčné membráně (Na^+/Ca^{2+} ATPáza, NCX) se uplatňují při vzestupu $[Ca^{2+}]_i$, kdy pumpují Ca^{2+} ven z buňky a Na^+ do cytoplazmy (Blaustein a Lederer, 1999).

Za klidových podmínek jsou inaktivní. Jejich aktivita je ovlivněna mnoha faktory, např. koncentrací iontů a ATP. Za určitých podmínek (depolarizace, zvýšení $[Na^+]_i$, snížení $[Na^+]_e$) se může spustit jejich zpětný chod a mohou zvyšovat $[Ca^{2+}]_i$. Role NCX při HPV zatím zůstává nejasná a byla zkoumána jen málo (Becker et al., 2007).

Jednotlivé kroky, kterými způsobuje hypoxie zvýšení $[Ca^{2+}]_i$, jsou poměrně jasně popsány. Hypoxie působí uvolnění Ca^{2+} z intracelulárních zásob (sarkoplazmatického retikula), což vede k dalšímu influxu Ca^{2+} prostřednictvím SOCC. Hypoxie také působí depolarizaci buněčné membrány, což působí influx Ca^{2+} prostřednictvím VOCC. Naproti tomu přesný časový sled těchto dějů, jejich vzájemná provázanost a důležitost jednotlivých procesů zůstává neobjasněna (Sylvester et al., 2012). Prvním krokem může být uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula, které vede k aktivaci SOCC. Depolarizace, která může být důsledkem otevření těchto kanálů spolu s dalšími kationtovými kanály a současné inhibice draslíkových kanálů, může aktivovat VOCC a tím způsobovat další influx Ca^{2+} . Dále se mohou uplatňovat Na/Ca výměníky.

Když je první fáze HPV závislá na mobilizaci Ca^{2+} z intracelulárních zásob a druhá na influxu Ca^{2+} z extracelulárního prostředí, mělo by k iniciálnímu zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ docházet bez depolarizace či předtím, než depolarizace nastane. Výsledky dvou studií na izolovaných hladkých svalových buňkách by tomu nasvědčovaly (Gelband a Gelband, 1997; Post et al., 1995). Membránový potenciál a $[Ca^{2+}]_i$ zároveň však zatím v jiných studiích nebyly zkoumány. Není jasné, jestli lze tyto výsledky generalizovat do fyziologičtějších podmínek.

Kontrakce závislá a nezávislá na Ca^{2+} – senzitivita k vápníku

V hladkých svalových buňkách je kontrakce umožněna fosforylací 20 kDa regulačního lehkého řetězce myozinu (MLC_{20}) (Somlyo a Somlyo, 1994). Tento řetězec je lokalizován v blízkosti vazebného místa pro aktin a jeho konformační změnou při fosforylací je umožněna vazba aktin-myozin, jejich vzájemný posun a tím kontrakce hladké svalové buňky.

Míra fosforylace lehkých řetězců myozinu (a tedy velikost tonu cévy nebo vazokonstrikce) je dána rovnováhou aktivity dvou enzymů. Kináza lehkého řetězce myozinu (MLCK) fosforyluje lehký řetězec myozinu a tím působí vazokonstrikci. Fosfatáza lehkého řetězce myozinu (MLCP) fosfát z lehkého řetězce myozinu odštěpuje, tím kontrakci brání a působí vazodilataci (Somlyo a Somlyo, 1994).

MLCK je enzym aktivovaný komplexem kalmodulin- Ca^{2+} . Jeho aktivita je tedy závislá na $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ při hypoxii v konečném důsledku aktivuje MLCK, která fosforylací lehkého řetězce myozinu umožňuje kontrakci hladké svalové buňky v cévní stěně a tím vazokonstrikci.

V hladkém svalu však není kontrakce regulována pouze zvýšením $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ale také senzitivitou k vápníku. Senzitivita hladké svalové buňky k Ca^{2+} je definována jako vztah mezi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a velikostí kontrakce. Posun tohoto vztahu k nižší $[\text{Ca}^{2+}]_i$ při stejné síle kontrakce (nebo vyšší síle kontrakce při stejné $[\text{Ca}^{2+}]_i$) znamená zvýšení senzitivity k Ca^{2+} – buňce ke stejné kontrakci stačí menší $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Zdá se, že při hypoxii je vzestup senzitivity k Ca^{2+} daný kombinací přímých účinků na hladké svalové buňky a nepřímých účinků zprostředkovaných endotelem (Robertson et al., 2003). Obecně vzato může být vzestup senzitivity dán buď zvýšením síly kontrakce jiným mechanismem než fosforylací MLC_{20} nebo zvýšením fosforylace MLC_{20} mechanismem

nezávislým na $[Ca^{2+}]_i$. Zatímco první možnost u HPV zatím nebyla více zkoumána, druhé je v poslední době věnována větší pozornost.

Jsou dvě možnosti, jak může dojít ke zvýšení fosforylace MLC_{20} nezávisle na $[Ca^{2+}]_i$. MLC_{20} může být fosforylován jinou kinázou než MLCK, a to takovou, která je nezávislá na $[Ca^{2+}]_i$. Bylo ukázáno, že různé kinázy včetně Rho kinázy mohou takto účinkovat, ale fyziologický význam tohoto účinku zůstává nejasný. Druhá možnost je inhibice enzymu MLCP, který MLC_{20} defosforyluje (MLCP není závislá na $[Ca^{2+}]_i$). Tento mechanismus je poměrně dobře zdokumentován a je pravděpodobně nejdůležitějším způsobem zvýšení senzitivity v hladké svalové buňce plicních cév (Somlyo a Somlyo, 2003).

MLCP může být přímo inhibována fosforylací Rho kinázou (Kimura et al., 1996). Fosforylace probíhá na podjednotce MYPT1. Rho kináza (RhoK nebo také ROCK) je serin/threonin kináza, která je aktivována malou monomerní GTPázou RhoA. Aktivita proteinu RhoA je řízena tím, jestli je na něj navázán GTP nebo GDP. Guanin nukleotidové výměnné faktory (guanin nucleotide exchange factors, GEF) aktivují RhoA tím, že vyměňují GDP navázané na RhoA za GTP. Aktivní RhoA se translokuje k sarkolemě, kde aktivuje RhoK. GTPázu aktivující proteiny (GTPase activating proteins, GAP) naopak hydrolyzují GTP navázané na RhoA na GDP a tím RhoA deaktivují. Mnoho různých agonistů může aktivovat RhoA prostřednictvím GEF (Somlyo a Somlyo, 2003). Tato dráha se tedy uplatňuje i při vazokonstrikci způsobené jiným stimulem než hypoxií.

Významnou roli RhoK při hypoxii potvrdila řada studií. Akutní hypoxie zvyšuje aktivitu RhoK, snižuje aktivitu MLCP a zvyšuje fosforylací MLC_{20} (Wang et al., 2003). Látky, které blokují přesun aktivního RhoA k sarkolemě, zablokovaly zvýšení aktivity RhoK způsobené hypoxií (Barbieri et al., 2002). Podobně inhibitory RhoK (Y-27632 a fasudil) zablokovaly hypoxií způsobené snížení aktivity MLCP a zvýšení fosforylace MLC_{20} . Y-27632 také zrušil

druhou setrvalejší fází hypoxické plicní vazokonstrikce (Wang et al., 2001). Oba inhibitory inhibovaly velikost hypoxické plicní vazokonstrikce, a to v pokusech na izolovaných cévách, izolovaných plicích i na živých zvířatech (Casey et al., 2010; Robertson et al., 2000a). Všechny tyto výsledky poukazují na důležitou roli RhoK v regulaci senzitivity k Ca^{2+} v hladké svalové buňce plicních cév. Přesný mechanismus, kterým hypoxie aktivuje RhoA, zatím však není znám.

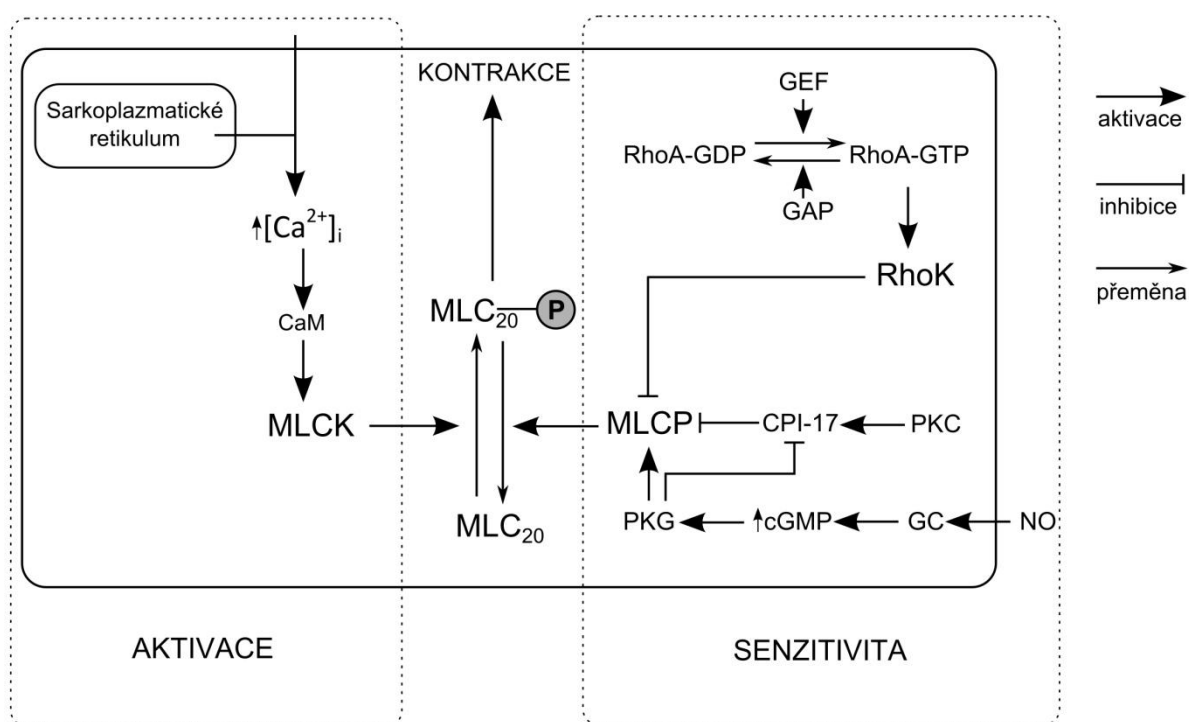
Zdá se, že interakce RhoK a dalších mechanismů v hladké svalové buňce je složitější. Inhibitory RhoK totiž také při hypoxii snížily $[\text{Ca}^{2+}]_i$, což ukazuje na účinek RhoK nejen na senzitivitu k vápníku, ale i přímo na jeho koncentraci (Wang et al., 2007). V určitých experimentech byla také k druhé setrvalejší fázi odpovědi na hypoxii nutná přítomnost endotelu (Robertson et al., 2003). To nasvědčuje nepřímému ovlivnění senzitivity endotelem, které může být neméně důležité.

RhoK není jediná možnost inhibice MLCP. CPI-17 (C-kinázou potencovaný inhibitor fosfatázy) je protein, který může být fosforylován proteinkinázou C. Fosforylovaný CPI-17 inhibuje MLCP interakcí s její katalytickou podjednotkou PP1 (Eto et al., 1995). Relativní podíl inhibice MLCP přes MYPT1 a CPI-17 se pravděpodobně liší v závislosti na konkrétní tkáni. V plicních cévách je přítomný fosforylovaný CPI-17 při chronické hypoxii (Fagan et al., 2004), o jeho roli při akutní hypoxii však nemáme jasné informace.

Kromě inhibice aktivity MLCP může být senzitivita k Ca^{2+} také zvýšena inhibicí drah, které MLCP aktivují. Nejznámější z nich je proteinkináza G (PKG), kterou aktivuje cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) vytvořený solubilní guanylátcyklázou. Tvorbu cGMP iniciuje nejčastěji oxid dusnatý (NO), jedna z nejdůležitějších vazodilatačních látek. Inhibitor NO syntázy L-NAME zvýšil senzitivitu k Ca^{2+} při normoxii, ale ne při hypoxii (Weigand et al.,

2011). Tyto výsledky nasvědčují tomu, že zvýšení senzitivity k Ca^{2+} při hypoxii může být také dáno sníženou produkcí NO.

Relativně nízká senzitivita při normoxii je nejspíše výsledkem interakce dvou protichůdných drah: 1) RhoK a PKC, které zvyšují senzitivitu inhibicí MLCP, a 2) NOS/PKG, která snižuje senzitivitu aktivací MLCP. Zvýšení senzitivity k Ca^{2+} při hypoxii může být tedy způsobeno snížením produkce NO (což má za následek snížení aktivity PKG), zvýšením aktivity RhoK a/nebo PKC, nebo kombinací více z těchto možností. Konečným důsledkem je vždy inhibice MLCP a zvýšení fosforylace MLC_{20} při nezměněné aktivitě MLCK a nezměněné $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Obr. 1.2).



Obr. 1.2 – Schéma aktivace kontrakce hladké svalové buňky a regulace senzitivity k vápníku. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ – intracelulární koncentrace Ca^{2+} , CaM – kalmodulin, MLCK – kináza lehkého řetězce myozinu, MLC_{20} – 20kDa lehký řetězec myozinu, GEF – guanin nukleotidové výměnné faktory, GAP – GTPázu aktivující proteiny, RhoK – Rho kináza, MLCP – fosfatáza lehkého řetězce myozinu, CPI-17 – C-kinázou potencovaný inhibitor fosfatázy, PKC – proteinkináza C, PKG – proteinkináza G, cGMP – cyklický guanosinmonofosfát, GC – guanylátcykláza, NO – oxid dusnatý.

Kyslíkové radikály při HPV

Reaktivní sloučeniny kyslíku (ROS) hrají v mechanismu HPV významnou roli. Bylo zjištěno, že změny v jejich produkci a v redoxním stavu buňky ovlivňují velikost HPV. Vápníkové kanály typu L mohou být aktivovány pomocí ROS (Wolin, 2000) a napětově řízené draslíkové kanály mohou být inhibovány při sníženém množství ROS. Existují dvě různé teorie ohledně role ROS v mechanismu HPV. Podle jedné snížené množství ROS při hypoxii způsobuje depolarizaci inhibicí napětově řízených draslíkových kanálů. Podle druhé se naopak tvorba ROS při hypoxii zvyšuje, což způsobí aktivaci vápníkových kanálů (Sylvester, 2001).

Tyto dvě protichůdné teorie vycházejí z protichůdných výsledků experimentů s oxidanty a antioxidanty. Peroxid vodíku způsobuje při normoxii vazokonstrikci plicních arterií (Sheehan et al., 1993; Wilhelm a Herget, 1995), ale antioxidanty také způsobují vazokonstrikci prostřednictvím inhibice draslíkových kanálů (Olschewski et al., 2004). Zároveň bylo ukázáno, že jak oxidanty (Jones et al., 1997; Olschewski et al., 2004), tak antioxidanty (Waypa et al., 2001) inhibují HPV.

Při výzkumu ROS při HPV bylo použito mnoho metod, ale konsensu ohledně snížení nebo zvýšení ROS nebylo dosaženo. Příčinou diskrepancí mohou být problematické metody validního měření ROS či různé experimentální metody v jednotlivých studiích. Také musíme brát v úvahu časový rámec experimentů vzhledem ke kinetice HPV. Přesto je zvláštní, že různé skupiny dospěly k tak rozdílným výsledkům. Je také možné, že regulace ROS probíhá na subcelulární úrovni a může se lišit v různých kompartmentech buňky (Murray et al., 2006).

Hypoxická plicní hypertenze

Plicní hypertenze je syndrom zvýšeného krevního tlaku v plicnici (Simonneau et al., 2009). Jedná se o heterogenní skupinu onemocnění, jejichž etiologie je různá, ale klinická prezentace je podobná a v konečném důsledku vedou k pravostrannému srdečnímu selhání a ke smrti. Současná klasifikace rozděluje plicní hypertenzi do 5 skupin (Simonneau et al., 2009). Jednou z těchto skupin je plicní arteriální hypertenze, která má zvláště nepříznivou prognózu a v současné době nemáme k dispozici uspokojivé terapeutické možnosti (Badesch et al., 2009). Chronická hypoxie způsobuje vznik plicní hypertenze (Groves et al., 1987). Proto patří mezi nejpoužívanější modely výzkumu plicní hypertenze na zvířatech plicní hypertenze vyvolaná hypoxií (hypoxická plicní hypertenze, HPH) (Reeves a Herget, 1984).

Spíše než jako na progresivní chorobu musíme na hypoxickou plicní hypertenzi pohlížet jako na adaptační proces na chronickou hypoxii. Při trvalém pobytu v hypoxii vzniká plicní hypertenze jako stabilní stav, který dále neprogreduje. Tento stav je reverzibilní – skončí-li expozice hypoxickému prostředí, dochází i k vymizení plicní hypertenze a k postupnému návratu stavu plicního řečiště k normálu (Bonnet et al., 2002; Herget et al., 1978).

K vzestupu plicní vaskulární rezistence dochází na základě dvou základních mechanismů – zvýšeného tonu plicních cév a jejich strukturální přestavby. Na obou těchto mechanismech se významně podílí poškození cév reaktivními sloučeninami kyslíku (Nozik-Grayck et al., 2007). Poznatek, že po delším pobytu ve vysoké nadmořské výšce není možné zvýšený tlak v plicnici normalizovat dýcháním čistého kyslíku, vedl k identifikaci strukturální přestavby cév jako důležité složky hypoxické plicní hypertenze (Groves et al., 1987). Vazokonstrikce má na zvýšení plicní vaskulární rezistence významný podíl na počátku vystavení hypoxii, zatímco postupem času je čím dále tím významnější právě fixní, remodelační složka (Reeves et al., 1986). Ta se týká zejména muskularizovaných plicních arteriol. Vzestup rezistence je

pak podmíněn proliferací hladkých svalových buněk a akumulací proteinů extracelulární matrix ve stěně těchto cév, zmenšením jejich lumen a snížením jejich poddajnosti (Stenmark et al., 2006).

Radikálové poškození při HPH

Významná role ROS v patogenezi HPH je obecně přijímána (Nozik-Grayck et al., 2007). Naše pracovní skupina se domnívá, že radikálové poškození cévní stěny je spouštěcím mechanismem pro zvýšení odporu periferních plicních cév (Herget et al., 2000). Adaptace na chronickou hypoxii je spojena se zvýšeným oxidačním stresem, který je zahrnut v indukci hypoxické plicní hypertenze – podání antioxidantu N-acetylcysteinu během adaptace vedlo k nižšímu stupni plicní hypertenze (Lachmanova et al., 2005).

Hypoxická plicní hypertenze je zejména v časných fázích onemocnění provázena také zvýšenou aktivitou inducibilní NO syntázy (Hampl, 2000; Hampl et al., 2006). Přibližně ve stejné době se v plicích zvýšeně generuje superoxid (Hodyc et al., 2012). Superoxid reaguje s NO za vzniku peroxynitritu (Beckman a Koppenol, 1996), který vede k oxidačnímu poškození.

Radikálové poškození periferních plicních cév je příčinou zvýšení jejich tonu (peroxid vodíku, superoxid i peroxynitrit působí plicní vazokonstrikci) (Wilhelm a Herget, 1995). Oxidační poškození stěny prealveolárních plicních cév je navíc příčinou remodelace jejich struktury. Stimuluje totiž kolagenolytické štěpení pojivových proteinů (Novotná a Herget, 2002). Plicní hypoxie se uplatňuje při iniciaci migrace a aktivaci žírných buněk, které jsou podstatným zdrojem enzymů účastnících se na metabolismu cévní pojivové matrix (Maxova et al., 2008). Takto vzniklé nízkomolekulární štěpy jsou důležité pro následný proces remodelace cévní struktury (Bačáková et al., 2002).

Rozpřažení NO syntázy

Jedním z možných zdrojů uvolnění kyslíkových radikálů je rozpřažení NO syntázy (Crabtree et al., 2009). Esenciálním kofaktorem NO syntáz, enzymů podílejících se na syntéze NO, je heterocyklická molekula (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH4). NO syntáza má dvě enzymatické domény, které musí být blízko sebe, aby mohla správně fungovat oxidace L-argininu na oxid dusnatý a citrulin. Při nedostatku BH4 se změnou konformace NO syntázy se tyto dvě domény oddálí (rozpřažení, uncoupling) a dojde také k odpojení procesu oxidace od argininu – místo něj se oxiduje molekulární kyslík, který se tím přemění na superoxid (Vásquez-Vivar et al., 1998). Zároveň se nevytvoří NO.

Působením oxidačního stresu může docházet k oxidaci BH4 na 7,8-dihydrobiopterin (BH2). BH2 nefunguje jako kofaktor při produkci NO a navíc může kompetovat s BH4 na jeho vazebném místě. Současná data ukazují, že klíčovým faktorem rozpřažení NO syntáz není jen absolutní koncentrace BH4, ale spíše snížení intracelulárního poměru BH4/BH2 (Crabtree et al., 2009). Exogenně dodaný BH4 může pozitivně ovlivnit poměr BH4/BH2 a tím obnovit spřažení NO syntázy a zvýšit produkci NO (Moens et al., 2008).

Poměr BH4/BH2 v buňce je dále regulován dihydrofolátreduktázou (DHFR), která se podílí na regeneraci oxidovaného BH2 na BH4. Je tedy patrné, že určitý buněčný pool BH4 reflektuje rovnováhu mezi syntézou BH4 de novo, ztrátou BH4 oxidací na BH2 a regenerací BH4 dihydrofolátreduktázou. Exprese DHFR je inhibována angiotensinem II (Chalupsky a Cai, 2005). Naše pracovní skupina již dříve ukázala, že inhibice angiotensin konvertujícího enzymu brání rozvoji hypoxické plicní hypertenze (Herget et al., 1996).

Zdá se, že endoteliální dysfunkce ve smyslu zhoršené produkce NO a zvýšeného uvolňování superoxidu je důležitým patofyziologickým mechanismem u mnoha chorob jako jsou hypertenze a srdeční selhání (Takimoto et al., 2005), diabetes mellitus (Cai et al., 2005)

či ateroskleróza (Antoniades et al., 2007). Tento mechanismus se může uplatňovat i v patogenezi hypoxické plicní hypertenze.

Rho kinázy při HPH

V řadě studií na zvířecích modelech bylo prokázáno, že stejně jako při hypoxické plicní vazokonstrikci hraje Rho kináza důležitou roli i při hypoxické plicní hypertenzi. U zvířat s hypoxickou plicní hypertenzí působí Rho kinázové inhibitory při akutním podání jako velmi účinná vazodilatancia (McMurtry et al., 2003; McNamara et al., 2008; Nagaoka et al., 2005; Nagaoka et al., 2006; Nagaoka et al., 2004). Inhibitory Rho kinázy také brání vývoji hypoxické plicní hypertenze – při jejich chronickém podávání během expozice hypoxii je výsledná hypoxická plicní hypertenze významně mírnější (Abe et al., 2006; Fagan et al., 2004; Nagaoka et al., 2006; Ziino et al., 2009). Inhibitory Rho kinázy měly efekt i u zvířat s již plně rozvinutou plicní hypertenzí. Při jejich dlouhodobém podávání došlo k jejímu zmírnění a ke zlepšení funkce pravé komory (Xu et al., 2010). Bylo i přímo ukázáno, že při hypoxické plicní hypertenzi se zvyšuje aktivita RhoA a exprese Rho kinázy (Nagaoka et al., 2006; Yang et al., 2006).

Akutní vazodilatační účinky inhibitorů Rho kinázy u plicní hypertenze byly až překvapivě velké v porovnání s běžnými vazodilatačními látkami (McMurtry et al., 2010; McMurtry et al., 2003; Nagaoka et al., 2005; Oka et al., 2007). Tyto výsledky vedly k novému pohledu na poměr vazokonstrikce a remodelace při plicní hypertenzi. Je pravděpodobné, že i ve fázi plně vyvinuté plicní hypertenze hraje vazokonstrikce periferních cév zprostředkovaná Rho kinázami významnou roli. Bez vaskulárního tonu má ztlustění stěny cév samo o sobě jen minimální vliv na zvýšení plicní vaskulární rezistence a celkový průřez plicního řečiště (McMurtry et al., 2010). Akutní inhibice Rho kinázy u zvířat s plicní hypertenzí způsobí kromě vazodilatace i návrat průtoku do periferních cév, které již nebyly perfundovány

(Schwenke et al., 2011). Ve stadiu plně vyvinuté plicní hypertenze hraje strukturální přestavba cév jistě větší roli než na počátku, ale význam Rho kinázou zprostředkované vazokonstrikce periferních cév pravděpodobně neklesá (McMurtry et al., 2010; Oka et al., 2007; Schwenke et al., 2011; Vanderpool et al., 2011).

Několik studií srovnávalo účinek fasudilu s ostatními používanými terapeutiky u plicní hypertenze. Ve srovnání s bosentanem a sildenafilem měl fasudil lehce vyšší účinek a při kombinované léčbě fasudil+bosentan a fasudil+sildenafil k žádnému dalšímu synergistickému účinku nedošlo (Mouchaers et al., 2010). Je možné, že Rho kináza je bodem, kam u plicní hypertenze konvergují patogenetické dráhy, a současné léky (bosentan, sildenafil) v konečném důsledku také ovlivňují Rho kinázu (Mouchaers et al., 2010; Oka et al., 2008).

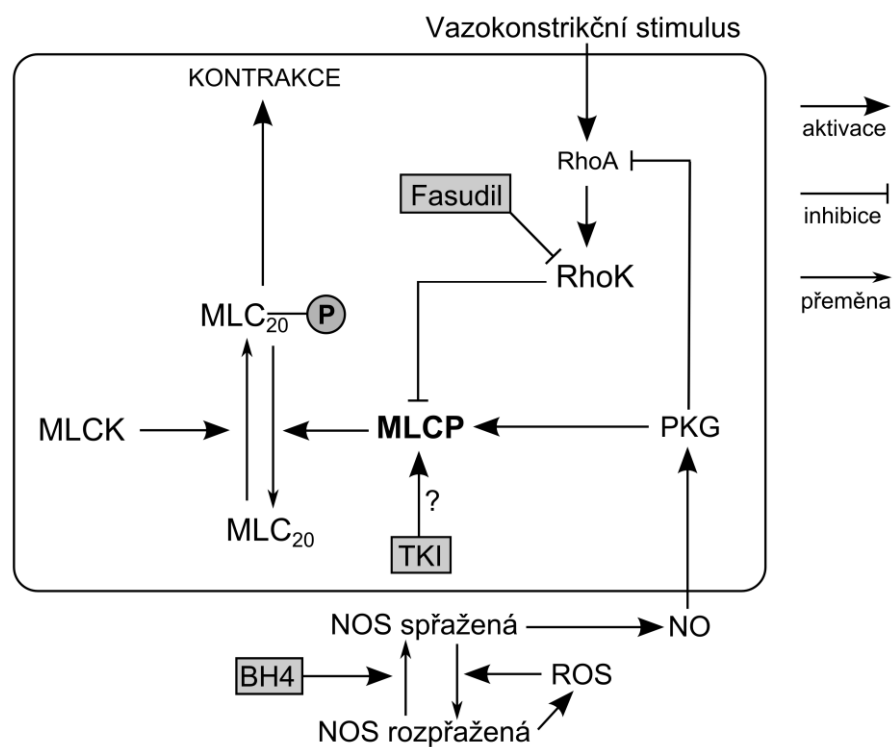
2. CÍLE A HYPOTÉZY

Zaměření práce

Tato práce se věnuje možnostem ovlivnění reaktivity plicních cév na hypoxii a jiné vazokonstrikční stimuly. Konečným cílem je pochopení a popis jednotlivých patogenetických mechanismů, které se uplatňují při vývoji plicní hypertenze. Jednotlivé mechanismy regulace tonu cév jsou na zvířecích modelech zpravidla nejprve testovány u normálních plic normoxických potkanů. Druhým krokem je pak pozorování těchto mechanismů při vývoji hypoxické plicní hypertenze s přihlédnutím k možnému terapeutickému ovlivnění patogeneze této choroby.

Regulace senzitivity cévních hladkých svalových buněk k vápníku je velice důležitým mechanismem regulace tonu plicních cév, ať už při akutní vazokonstrikci nebo při rozvoji hypoxické plicní hypertenze. Nejdůležitějším bodem regulace senzitivity k vápníku je regulace aktivity fosfatázy lehkého řetězce myozinu (MLCP) (Somlyo a Somlyo, 2003).

Práce se zaměřuje na tři mechanismy, které všechny mohou ovlivňovat aktivitu MLCP (a tedy senzitivitu k vápníku) a jejichž změny se mohou uplatňovat v patogenezi hypoxické plicní hypertenze (Obr. 2.1).



Obr. 2.1 – Schéma regulace aktivity fosfatázy lehkého řetězce myozinu zkoumanými drahami a možnosti zásahu použité v experimentech (šedé rámečky). MLCK – kináza lehkého řetězce myozinu, MLC₂₀ – 20kDa lehký řetězec myozinu, RhoK – Rho kináza, MLCP – fosfatáza lehkého řetězce myozinu, PKG – proteinkináza G, NOS – NO syntáza, NO – oxid dusnatý, ROS – reaktivní sloučeniny kyslíku, BH₄ – tetrahydrobiopterin, TKI – inhibitory tyrosinkináz.

Hypotézy

Rho kinázy

Rho kinázy hrají zásadní roli v regulaci senzitivity cévních hladkých svalových buněk k vápníku. Byla popsána jejich významná role při hypoxické plicní vazokonstrikci i hypoxické plicní hypertenzi. Rho kinázy v reakci na vazokonstrikční stimulus inaktivují MLCP fosforylací její podjednotky MYPT1 (Kimura et al., 1996), tím zvyšují senzitivitu k vápníku a potencují vazokonstrikční odpověď.

Domníváme se, že akutní inhibice Rho kináz bude u zvířat s hypoxickou plicní hypertenzí působit vazodilataci a jejich chronická inhibice může bránit progresi plicní hypertenze. Při testování této hypotézy se zaměříme na vztah závislosti perfuzního tlaku na zvyšujícím se průtoku v izolovaných perfundovaných plicích.

Rozpřažení NO syntázy

Oxid dusnatý je jednou z nejdůležitějších vazodilatačních látek. V mechanismu účinku NO se také uplatňuje regulace senzitivity k vápníku, a sice kalciová desenzitizace. NO aktivuje solubilní guanylátcyklázu. Zvýšení koncentrace cGMP dále aktivuje proteinkinázu G (PKG), která aktivuje MLCP (Lincoln et al., 2001) a tím snižuje senzitivitu k vápníku. Bylo také popsáno, že PKG může přímo fosforylovat RhoA a tím inhibovat Rho kinázovou dráhu (Sauzeau et al., 2000). Při akutní HPV může být vzestup senzitivity k vápníku také daný současně sníženou produkcí NO (Weigand et al., 2011). Porucha produkce NO v důsledku rozpřažení NO syntázy může přispívat ke zvýšené senzitivě k vápníku při chronické hypoxii.

Domníváme se, že zvýšení oxidačního stresu při chronické hypoxii (Nozik-Grayck et al., 2007) snižuje poměr BH4/BH2 v buňce. Následné rozpřažení NO syntázy může dále zvyšovat oxidační stres a přispívat k progresi hypoxické plicní hypertenze. Bude zkoumána reaktivita

plicních cév zvířat vystavených chronické hypoxii na exogenní podání BH4 a dále vliv podaného BH4 na množství vydechovaného NO.

Inhibitory tyrosinkináz

Inhibitory tyrosinkináz se používají k léčbě maligních onemocnění (Cohen et al., 2002). Imatinib, inhibitor PDGFR (receptor platelet-derived růstového faktoru), je také slibným lékem pro léčbu plicní hypertenze (Ghofrani et al., 2005). Ve zvířecích modelech podávání inhibitorů tyrosinkináz zmírnilo rozvoj plicní hypertenze (Klein et al., 2008; Schermuly et al., 2005). Tento efekt byl vysvětlován inhibicí buněčných růstových faktorů a tedy inhibicí remodelace plicních cév. Může být však také dán (alespoň částečně) vazodilatačním účinkem. Léčba imatinibem u zvířat s již vyvinutou plicní hypertenzí snížila tlak v pravé komoře relativně rychle (Schermuly et al., 2005). Proto je otázkou, jestli může být účinek imatinibu vysvětlen pouze regresí remodelace plicních cév. Tento náález by mohl podporovat naši hypotézu vazodilatačního účinku inhibitorů tyrosinkináz.

Domníváme se, že inhibitory tyrosinkináz budou mít vazodilatační účinek v plicním cévním řečišti a sníží plicní cévní rezistenci. Součástí této hypotézy je také jejich možný vliv na senzitivitu k vápníku (mohou působit kalciovou desenzitizací). Tuto hypotézu budeme testovat na modelu plicní hypertenze u potkana vyvolané hypoxií + bloádou receptoru vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (Oka et al., 2007).

3. MATERIÁL A METODY

Laboratorní zvířata

Pro pokusy s fasudilem a BH4 byli použiti dospělí samci potkana kmene Wistar. Indukce plicní hypertenze byla provedena umístěním zvířat do normobarické hypoxické komory (10% O₂) na 4 nebo 7 dní (Hampl a Herget, 1990). Kontrolní potkani byli drženi v normoxickém prostředí.

Pro pokusy s tyrosinkinázovými inhibitory byli použiti dospělí samci potkana kmene Sprague-Dawley. Indukce plicní hypertenze byla u nich provedena podle modelu SU5416/hypoxie/normoxie – byl jim injekčně podán SU5416 (inhibitor receptoru vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, 20 mg/kg), poté byli vystaveni chronické hypoxii (10% O₂) po 3 týdny a dále byli navraceni do normoxie na další 2 týdny (Oka et al., 2007).

Inhibitory Rho kináz

Experiment 1A – Izolované perfundované plíce, vliv fasudilu na vazokonstrikci

V tomto experimentu byl studován vliv akutního podání fasudilu na plicní reaktivitu u normoxických zvířat (n=4). Pokus byl proveden na preparátu izolovaných perfundovaných plic laboratorního potkana (Herget a Chovanec, 2010). Po anestezii thiopentalem sodným (40mg/kg intraperitoneálně) byla zakanylována trachea a plíce byly ventilovány frekvencí 50 dechů/min při špičkovém tlaku 10 cm H₂O a pozitivním tlaku na konci výdechu (PEEP) 2 cm H₂O. Vtoková kanyla byla zavedena do plicnice a výtoková kanyla do levé srdeční

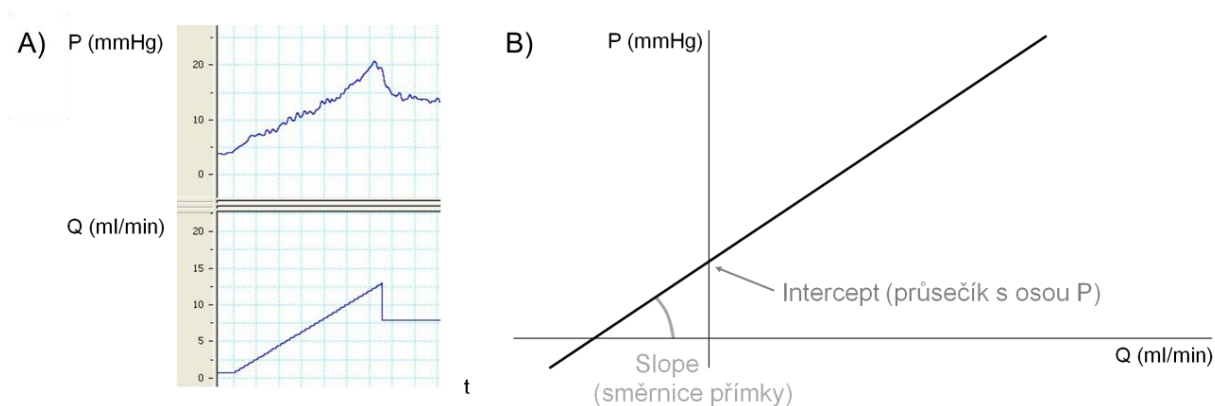
komory. Preparát srdce a plic byl poté umístěn do vlhké komůrky zahříváné na teplotu 38°C. K perfúzi plic byl použit solný roztok s albuminem (4g/100ml perfuzátu) a meklofenamátem (inhibitor cyklooxygenázy, 17 μ M). Průtok byl udržován konstantní (4ml/min na 100g hmotnosti zvířete). Plíce byly ventilovány normoxickou směsí plynů (21% O₂, 74% N₂, 5% CO₂) nebo hypoxickou směsí (95% N₂, 5% CO₂) pro vyvolání hypoxické plicní vazokonstrikce. Perfuzní tlak v plicnici byl měřen pomocí transduceru (PowerLab, AD Instruments, Spechbach, Německo). Změny perfuzního tlaku při konstantním průtoku odpovídaly změnám plicní cévní rezistence. Po přípravě preparátu izolovaných perfundovaných plic byl preparát ponechán po dobu 20 min ke stabilizaci před vlastním zahájením experimentu.

Po stabilizaci preparátu izolovaných perfundovaných plic byla opakovaně testována reaktivita na angiotensin II (ATII, bolus 0,2 μ g ve 20 μ l do vtokové kanyly) a hypoxii (ventilace 95% N₂ + 5% CO₂, dokud vazokonstrikce nedosáhla ustálené hodnoty – většinou 5 min). Změna perfuzního tlaku způsobená těmito stimuly byla měřena a vyhodnocena jako velikost vazokonstrikce. Mezi jednotlivými vazokonstrikčními stimuly byly ponechány pauzy 10 min. Jako referenční byla brána vazokonstrikce způsobená druhým podáním ATII a druhým hypoxickým stimulem. Poté byl do perfuzátu přidán inhibitor Rho kinázy fasudil (10 μ M). Po další stabilizační periodě (10 min) byla opět měřena odpověď na ATII a hypoxii. Byly srovnány velikosti vazokonstrikční odpovědi na tyto stimuly před a po podání fasudilu.

Experiment 1B – Izolované perfundované plíce, akutní podání fasudilu

V tomto experimentu byl studován vliv akutního podání fasudilu na závislost perfuzního tlaku na průtoku. Byly použity dvě skupiny zvířat – skupina, která strávila 7 dní v hypoxii (n=7) a kontrolní normoxická skupina (n=6).

Pokus byl proveden na preparátu izolovaných perfundovaných plic obdobně jako experiment 1A. Po otestování normální reaktivity na ATII (bolus 0,2 μg ve 20 μl do vtokové kanyly) a hypoxii (ventilace 95% N_2 + 5% CO_2) byla změřena závislost perfuzního tlaku na zvyšujícím se průtoku (P/Q). Perfuzní pumpa byla nejdříve zcela zastavena. Po ustálení perfuzního tlaku byl kontinuálně zvyšován průtok až na 150% klidového průtoku a byly zaznamenávány odpovídající změny perfuzního tlaku. Z těchto hodnot byla vypracována závislost tlaku na zvyšujícím se průtoku. Pomocí parametrů této závislosti lze odhadnout bazální tonus plicních cév a jejich odpor. Poté byl do perfuzátu přidán fasudil (10 μM). Po další stabilizační periodě (10 min) byla závislost P/Q změřena znovu. Parametry přímky P/Q (Obr. 3.1) před a po podání fasudilu byly srovnány v rámci obou skupin.



Obr. 3.1 – Hodnocení závislosti P/Q. (A) Část experimentálního záznamu, která ukazuje záznam perfuzního tlaku (nahore) v závislosti na zvyšujícím se průtoku (dole). (B) Hodnocení parametrů závislosti P/Q.

Experiment 1C – Izolované perfundované plíce, chronické podávání fasudilu

V tomto experimentu byl studován vliv chronického podání fasudilu na závislost perfuzního tlaku na průtoku u hypoxických zvířat. Fasudil (30 mg/kg/den intraperitoneálně) byl podáván po celou dobu vystavení hypoxii zvířatům, která strávila 7 dní hypoxii (n=7). Kontrolní skupinu tvořili potkani rovněž vystavení hypoxii po 7 dní, kteří nebyli fasudilem léčeni (n=6).

Experiment byl rovněž proveden na preparátu izolovaných perfundovaných plic. Po otestování normální reaktivity na ATII (bolus 0,2 μg ve 20 μl do vtokové kanyly) a hypoxii (ventilace 95% N_2 + 5% CO_2) byla změřena závislost P/Q. Byly porovnány parametry přímky P/Q obou skupin.

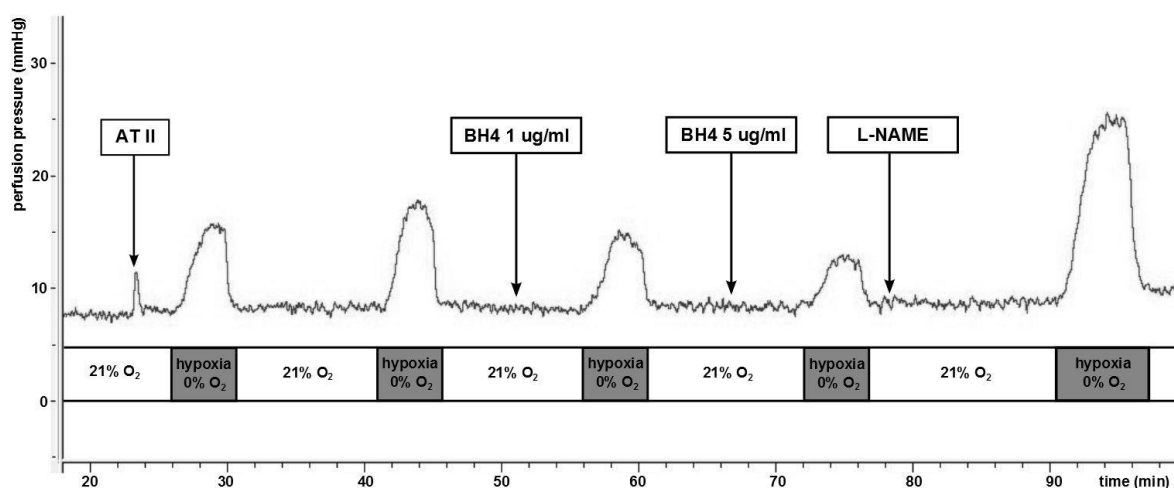
BH4

Experiment 2A – Izolované perfundované plíce

V tomto experimentu byl studován vliv akutního exogenního podání BH4 na velikost hypoxické plicní vazokonstrikce na izolovaných perfundovaných plicích. Byly použity dvě skupiny potkanů – skupina vystavená chronické hypoxii po 4 dny (n=7) a kontrolní normoxická skupina (n=8).

Po otestování reaktivity na ATII (bolus 0,2 μg ve 20 μl do vtokové kanyly) byly k vyvolání hypoxické plicní vazokonstrikce použity opakované periody ventilace hypoxickou směsí plynů (95% N_2 + 5% CO_2). Ventilace hypoxickou směsí trvala, dokud změna tlaku nedosáhla maxima (zpravidla 5 min), a tato změna byla vyhodnocena jako velikost vazokonstrikce. Mezi hypoxickými stimuly byly intervaly 10 min ventilace normoxickou směsí. Jako kontrolní byla brána druhá reakce na hypoxii. Před třetím hypoxickým stimulem byl podán do perfuzátu BH4 v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a před čtvrtým hypoxickým stimulem BH4 v koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$. Poté byl do perfuzátu přidán L-NAME (inhibitor všech izoform NO syntázy, 50 μM) a byla vyvolána poslední hypoxická plicní vazokonstrikce (Obr. 3.2). Velikosti HPV po podání obou koncentrací BH4 a L-NAME byly porovnány s kontrolní HPV.

BH4 přidávaný do perfuzátu byl rozpuštěn v HEPES pufovaném roztoku (NaCl 137 mM, KCl 4 mM, CaCl_2 1,8 mM, MgCl_2 1 mM, HEPES 10 mM, glukóza 10 mM, pH titrováno na 7,4 pomocí NaOH) (Francis et al., 2010).



Obr. 3.2 – Protokol experimentu 2A. 21% O₂ představuje ventilaci směsí 21% O₂ + 74% N₂ + 5% CO₂. Hypoxia 0% O₂ představuje ventilaci směsí 95% N₂ + 5% CO₂. ATII představuje podání angiotenzinu II (0,2 µg) a L-NAME podání L-NAME (50 µM).

Experiment 2B – Izolované periferní plicní cévy, inhibice HPV

V tomto experimentu byl studován vliv akutního exogenního podání BH4 na velikost akutní hypoxické plicní vazokonstrikce na izolovaných periferních plicních cévách. Byla použita jedna skupina normoxických zvířat (n=8).

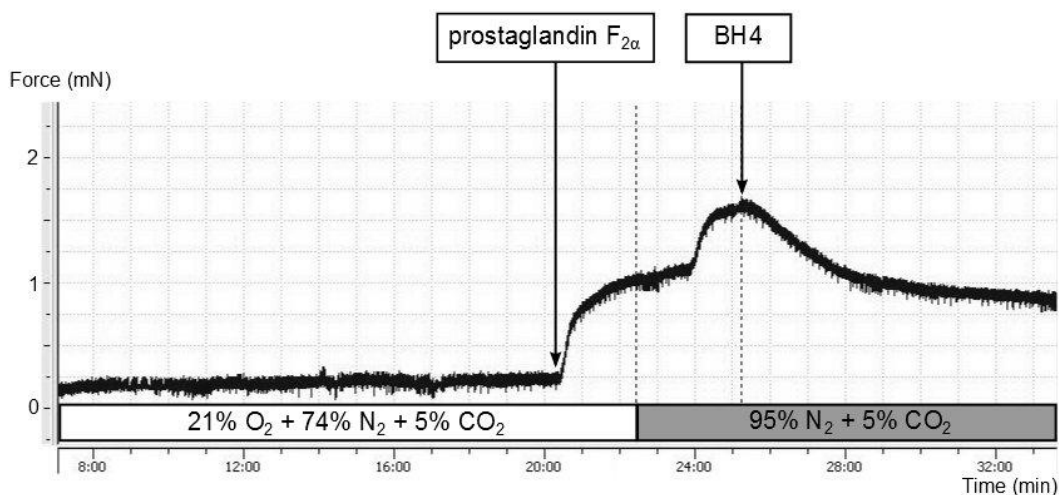
Po anestezii potkanů pentobarbitalem sodným (150 mg/kg intraperitoneálně) byly pod disekčním mikroskopem izolovány periferní plicní cévy z levé plíce. Byly použity větve čtvrtého nebo pátého řádu (vnitřní průměr 0,3 – 0,5 mm). Cévní kroužky byly poté zavěšeny na myograf (model 500A) (Rogers et al., 1992). Každý kroužek byl umístěn do komůrky naplněné 10 ml fyziologického roztoku. V komůrkách byla udržována teplota 37°C a byly kontinuálně probublávány směsí plynů (21% O₂, 74% N₂, 5% CO₂). Cévní kroužky byly automaticky distendovány tenzí, která by byla dosažena při klidovém intravaskulárním tlaku 20 torr (jak bylo popsáno pro systémové cévy Mulvany a Halpern, 1977). Po stabilizační době 60 min byla dvakrát indukována maximální kontrakce pomocí 80 mM KCl. Po dalších 20 min byly kroužky prekontrahovány 0,1 mM prostaglandinem F2α.

Poté, co vazokonstrikce vyvolaná prostaglandinem F2 α dosáhla vrcholu, bylo k indukci HPV použito probublávání hypoxickou směsí (95% N₂, 5% CO₂) po dobu 15 min. Po další stabilizaci v normoxii bylo zopakováno pět dalších hypoxických stimulů. Před nimi byl podán BH4 do komůrky myografu v koncentracích 1 μ g/ml, 5 μ g/ml a 20 μ g/ml. Před posledním stimulem byl přidán L-NAME (50 μ M). Reaktivita na hypoxii byla testována vždy 10 min po podání těchto látek. Velikosti HPV po podání různých koncentrací BH4 a L-NAME byly porovnány s velikostí první HPV.

Experiment 2C – Izolované periferní plicní cévy, dynamika vazodilatace

V tomto experimentu byl studován vazodilatační efekt BH4 na izolované periferní plicní cévy chronicky hypoxických a normoxických zvířat. Byly použity dvě skupiny potkanů – hypoxická (4 dny hypoxie, n=12) a kontrolní normoxická (n=12).

Experiment byl rovněž proveden na izolovaných periferních plicních cévách. Poté, co vazokonstrikce vyvolaná prostaglandinem F2 α dosáhla vrcholu, bylo k indukci HPV použito probublávání hypoxickou směsí (95% N₂, 5% CO₂) podobně jako v experimentu 2B. Ve chvíli maximální HPV byl do komůrky myografu přidán BH4 v koncentraci 100 μ g/ml (Obr. 3.3). Po podání BH4 byl měřen vazodilatační čas (čas, za který klesl tonus cévního kroužku na 50% původní hodnoty). Byly srovnány vazodilatační časy obou skupin.



Obr. 3.3 – Protokol experimentu 2C.

Prostaglandin F_{2α} byl podán v koncentraci 0,1 mM a BH4 100 µg/ml.

Experiment 2D – Měření NO ve vydechovaném vzduchu

V tomto experimentu byl studován vliv chronického podávání BH4 na produkci NO v plicích u chronicky hypoxických a normoxických zvířat. Jedna skupina byla po 4 dny v hypoxické komoře s 10% O₂ (n=8), druhá byla v normoxickém prostředí (n=6).

Po 4 dnech byla u všech zvířat změřena koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu. Každý potkan byl uzavřen ve skleněné sklenici o objemu 2 l, která byla předtím profouknuta vzduchem bez NO. Koncentrace NO ve sklenici byla změřena po 10 min pomocí chemiluminiscenčního analyzátoru (NOA 280i, Sievers) (Hampl et al., 2006). Všem zvířatům byl poté podáván BH4 rozpuštěný ve vodě na pití (20 mg/l) po dobu jednoho dne. Poté bylo zopakováno měření koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu. Dále byl v pitné vodě všem zvířatům podáván L-NIL (specifický inhibitor inducibilní NO syntázy, 8 mg/l) po dobu dalšího jednoho dne. Poté bylo provedeno poslední měření koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu.

Inhibitory tyrosinkináz

Experiment 3A – Izolované plicnice

V tomto experimentu byl studován vazodilatační účinek inhibitorů tyrosinkináz na izolovaných velkých plicních cévách (kroužky z plicnic). Byly použity cévní kroužky z plicnic normoxických potkanů. Kroužky měly intaktní endotel nebo byly endotelu zbaveny (n=4 pro každou skupinu). 20 min po podání U46619 (analog tromboxanu A₂, 100 nM) nebo serotoninu (10 mM) byla stanovena závislost tenze ve stěně na koncentraci imatinibu (1–30 mM). Serotonin a analog tromboxanu byly použity proto, že se uplatňují v patogenezi různých experimentálních forem plicní hypertenze.

Dále byla stanovena závislost tenze na koncentraci imatinibu, nilotinibu a sorafenibu, a to na kroužcích z plicnic s intaktním endotelem ze zvířat skupiny SU5416/hypoxie/normoxie a kontrolní normoxické skupiny (v každé skupině n=8 pro imatinib, n=4 pro nilotinib a n=4 pro sorafenib). Protože imatinib způsobil relaxaci cévních kroužků nezávislou na endotelu a protože podle našich předběžných výsledků tomu tak bylo i u ostatních tyrosinkinázových inhibitorů, při dalších experimentech byla inhibována NO syntáza. Po 60 min ekvilibrace byl ke všem kroužkům přidán N ω -nitro-L-arginin (L-NNA, 200 mM). L-NNA způsobuje zřetelnou vazokonstrikci u hypertenzních, ale ne normotenzních plicnic (Oka et al., 1993). Pro všechny tři inhibitory tyrosinkináz (0,1 – 100 mM) byl stanoven vztah koncentrace-tenze u normotenzních kroužků z plicnic prekontrahovaných pomocí U46619 (100 nM) a u hypertenzních kroužků prekontrahovaných pomocí L-NNA.

Experiment 3B – Katetrizace

Akutní hemodynamické účinky imatinibu byly testovány v celkové anestezii u katetrizovaných potkanů s plicní hypertenzí (model SU5416/hypoxie/normoxie). Po změření klidových hodnot (baseline) byl intravenózně podán imatinib (20 nebo 50 mg/kg, celkový objem 0,1 ml) a hemodynamické parametry byly monitorovány 10 minut (účinek imatinibu se ustálil za 5 min). V některých případech byl podán imatinib v dávce 5 mg/kg nejméně 15 min před podáním vyšších dávek (tato dávka neměla žádný signifikantní hemodynamický efekt). Na konci experimentu byl potkan zabit předávkováním pentobarbitalem sodným a srdce bylo odebráno ke změření hmotnostního poměru pravá komora/levá komora + septum (RV/LV+S) jako ukazatele hypertrofie pravé komory.

Experiment 3C – Western blot

V tomto experimentu byl studován vliv tyrosinkinázových inhibitorů na aktivitu MLCP a fosforylaci MLC₂₀. Byly použity kroužky z plicnic normoxických potkanů. Kroužky byly umístěny do stejného roztoku jako v experimentu s měřením tenze. Po 60 min ekvilibrace byl ke všem kroužkům přidán L-NNA (200 mM) na 10 min. Dále byly kroužky rozděleny do tří skupin a (1) nebyla přidána žádná další látka, (2) bylo přidáno U46619 (100 nM), nebo (3) bylo přidáno U46619 a dále imatinib (30 μM). Po dalších 30 min byly kroužky rychle zmrazeny ponořením do směsi suchého ledu a acetonu s 10% kyselinou trichloroctovou a uskladněny při -80°C pro další analýzu (Tsai a Jiang, 2006).

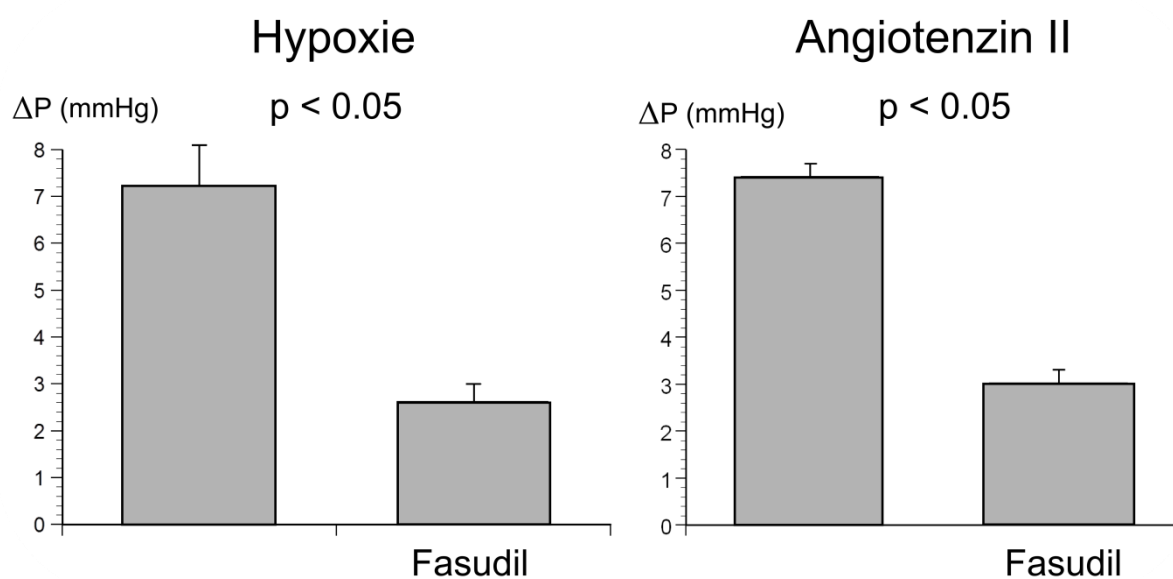
Statistická analýza výsledků

Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (standardní chyba průměru), n představuje počet zvířat ve skupině. Za statisticky signifikantní byla považována hodnota $p < 0.05$. K vyhodnocení výsledků byl použit t-test, párový t-test, ANOVA pro opakovaná měření nebo ANOVA s Scheffeho post hoc testem (vždy vhodná metoda podle povahy dat). Ke statistické analýze byl použit program StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4. VÝSLEDKY

Vliv inhibice Rho kináz na velikost plicní vazokonstrikce

Velikost hypoxické plicní vazokonstrikce i vazokonstrikce způsobené angiotensinem II byla po podání fasudilu signifikantně inhibována (Obr. 4.1).



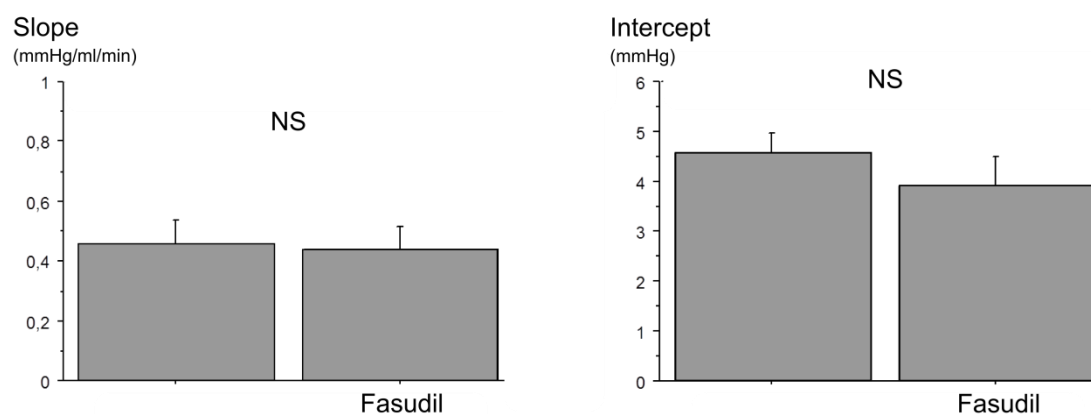
Obr. 4.1 – Inhibice HPV a vazokonstrikce způsobené ATII fasudilem (10 μ M). Na obrázku je změna perfuzního tlaku způsobená hypoxií (ventilace 95% N₂ + 5% CO₂) a angiotensinem II (bolus 0,2 μ g).

Vliv akutní a chronické inhibice Rho kináz na vztah P/Q

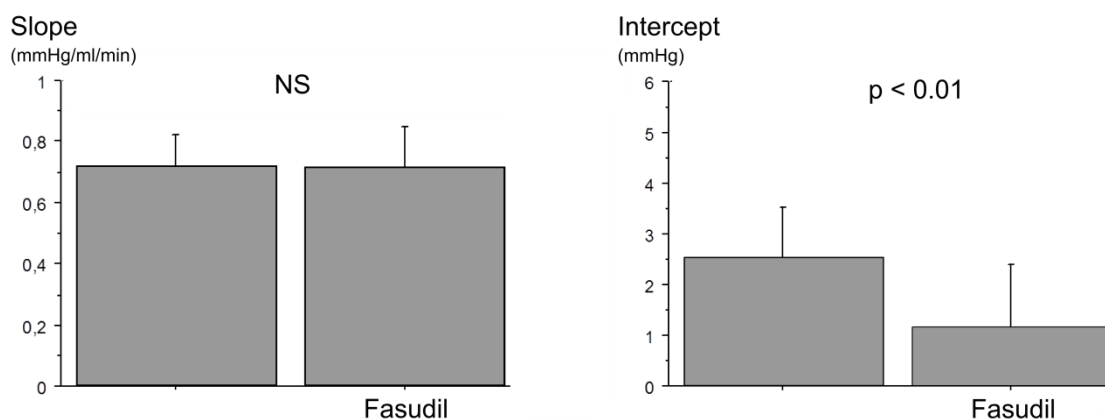
Vztah P/Q byl u všech skupin lineární ($r > 0,88$). Na přímce závislosti P/Q můžeme hodnotit dva parametry – směrnici přímky (slope), která odpovídá odporu, který plicní řečiště klade zvyšujícímu se průtoku, a hodnotu průsečíku s osou perfuzního tlaku (intercept), která odpovídá bazálnímu tonu plicních cév.

Akutní podání fasudilu neovlivnilo vztah P/Q u kontrolní skupiny (Obr. 4.2). U hypoxické skupiny způsobilo akutní podání fasudilu signifikantní snížení hodnoty intercept – průsečíku s osou perfuzního tlaku (Obr. 4.3).

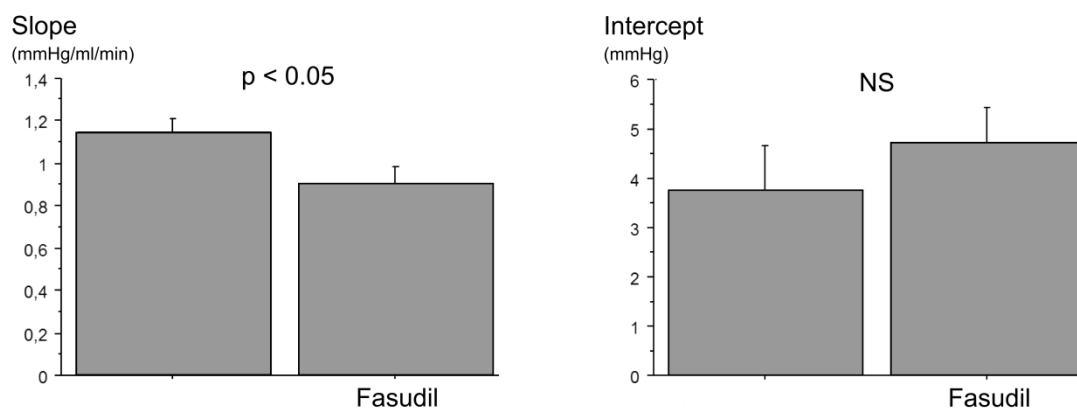
Chronická inhibice Rho kináz fasudilem během vystavení hypoxii způsobila oproti kontrolní skupině vystavené chronické hypoxii signifikantní pokles hodnoty slope – směrnice přímky (Obr. 4.4).



Obr. 4.2 – Vliv akutního podání fasudilu (10 μ M) na parametry závislosti P/Q u kontrolní skupiny.



Obr. 4.3 – Vliv akutního podání fasudilu (10 μ M) na parametry závislosti P/Q u hypoxické skupiny (7 dní hypoxie).

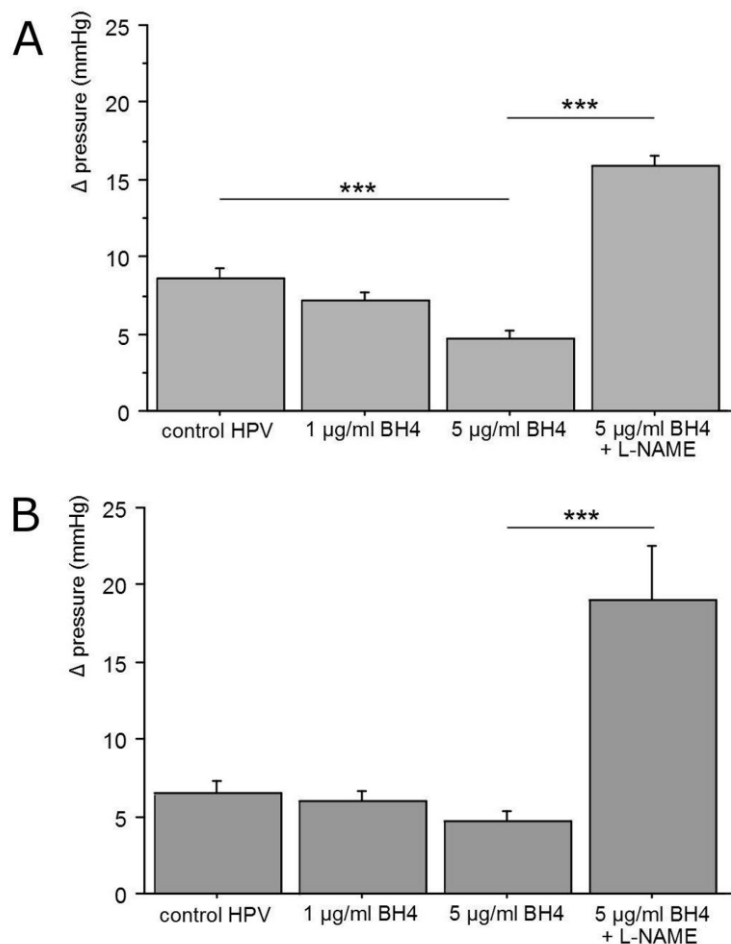


Obr. 4.4 – Vliv chronického podávání fasudilu (30 mg/kg/den, podávání během 7 dnů vystavení hypoxii) na parametry závislosti P/Q.

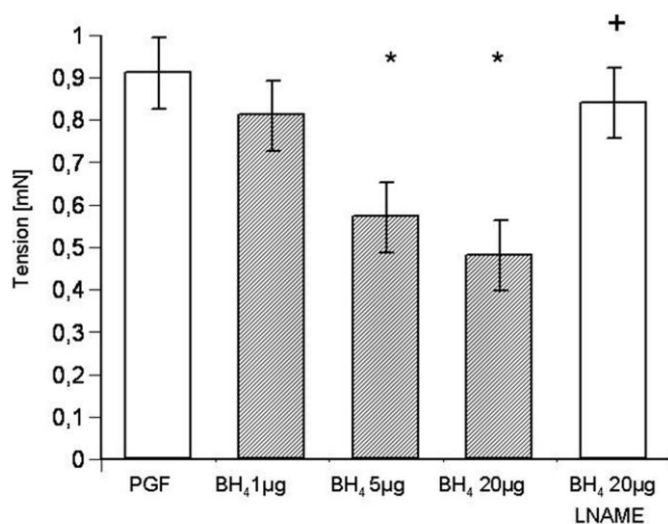
Vliv BH4 na hypoxickou plicní vazokonstrikci

Podání BH4 inhibovalo hypoxickou plicní vazokonstrikci v experimentech na izolovaných plicích. Tento účinek byl signifikantní pouze u normoxických plic a ve vyšší použité koncentraci (5 $\mu\text{g/l}$). U obou skupin byl tento efekt zablokován následným podáním L-NAME (Obr. 4.5). Podobně inhiboval BH4 hypoxickou plicní vazokonstrikci i v experimentech na izolovaných periferních plicních cévách. Vazodilatační účinek BH4 byl rovněž plně zablokován podáním L-NAME (Obr. 4.6).

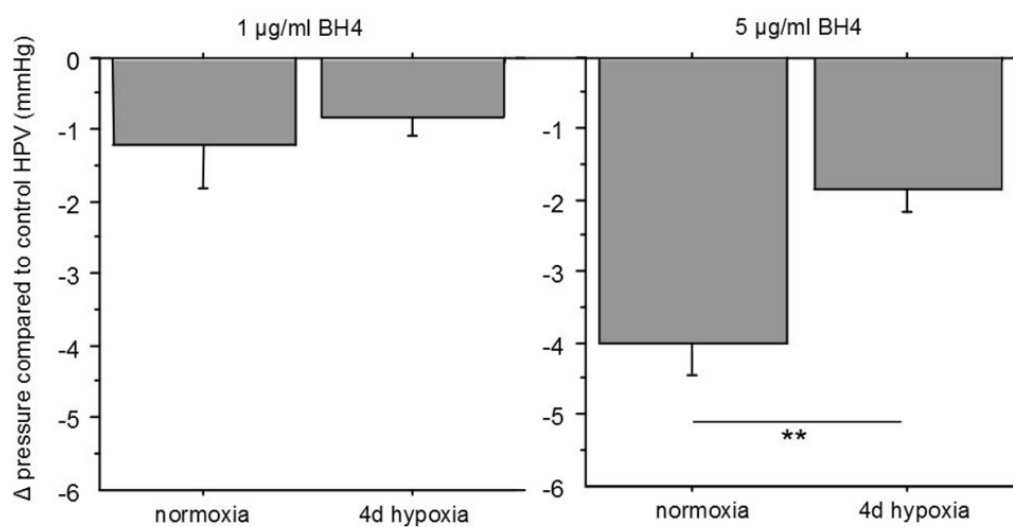
Inhibiční účinek BH4 na HPV byl vyšší u normoxických plic než u hypoxických plic. Při koncentraci 5 $\mu\text{g/l}$ byl v inhibici HPV mezi oběma skupinami signifikantní rozdíl (Obr. 4.7). Signifikantní rozdíl byl i mezi vazodilatačními časy izolovaných cév z hypoxických a normoxických plic, vazodilatační čas hypoxických cév byl kratší (Obr. 4.8). Při koncentraci 1 $\mu\text{g/l}$ v izolovaných plicích mezi skupinami žádný signifikantní rozdíl nebyl (Obr. 4.7). Zároveň nebyl mezi skupinami žádný signifikantní rozdíl v absolutní velikosti HPV po podání L-NAME (Obr. 4.6).



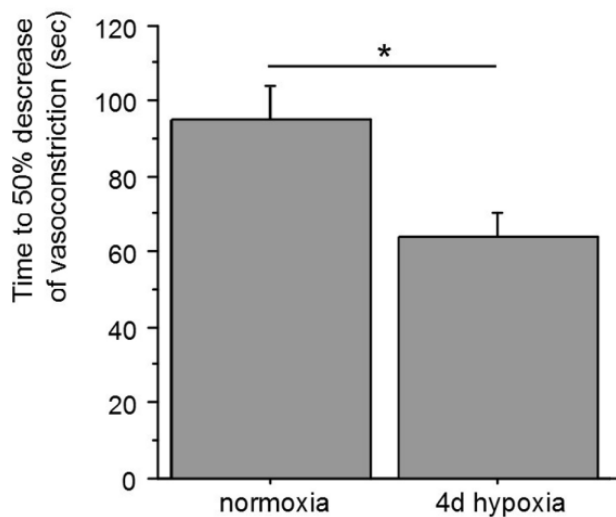
Obr. 4.5 – Vliv BH4 na velikost HPV v izolovaných plicích u (A) kontrolní skupiny a (B) u skupiny vystavené 4 dnům hypoxie. Na obrázku je změna perfuzního tlaku způsobená hypoxií (ventilace 95% N₂ + 5% CO₂). *** p < 0.0001.



Obr. 4.6 – Vliv BH4 na velikost HPV v izolovaných periferních plicních cévách. Na obrázku je změna tenze způsobená hypoxií (probublávání 95% N₂ + 5% CO₂). * p < 0.05 ve srovnání s PGF, + p < 0.05 ve srovnání s BH4 20 μg/ml.



Obr. 4.7 – Rozdíl v účinku BH4 v izolovaných plicích u normoxické a hypoxické skupiny (4 dny hypoxie). Na obrázku je inhibice HPV způsobená příslušnými koncentracemi BH4 (snížení změny perfuzního tlaku způsobené hypoxií po podání BH4). ** $p < 0.01$



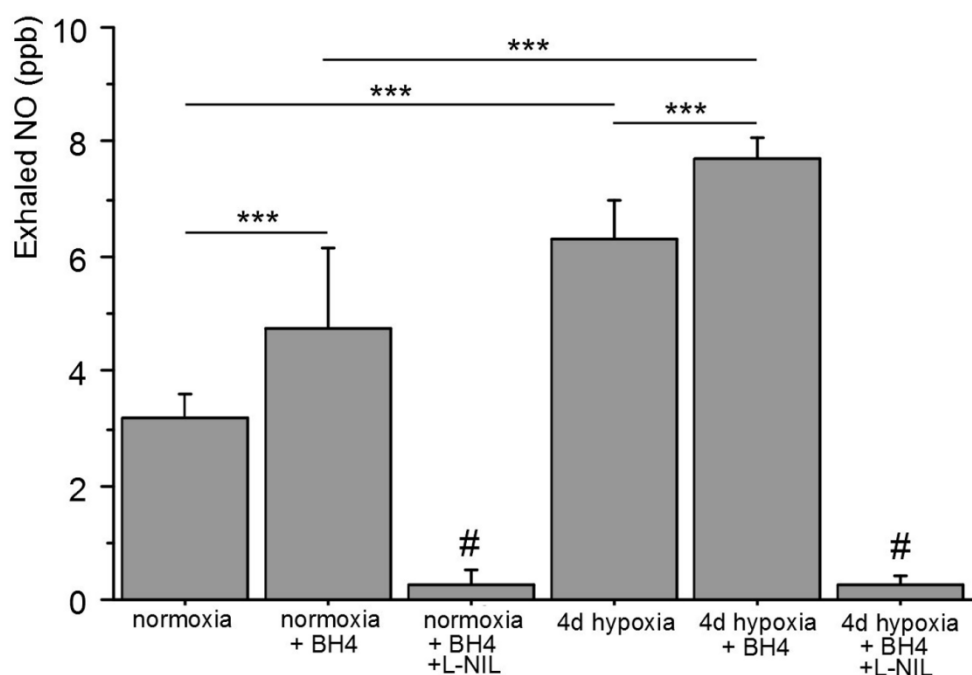
Obr. 4.8 – Rozdíl vazodilatačních časů po podání BH4 v izolovaných periferních plicních cévách u normoxické a hypoxické skupiny (4 dny hypoxie). * $p < 0.05$.

Vliv BH4 na produkci NO v plicích

Chronická hypoxie zvyšuje produkci NO v plicích. Při srovnání odpovídajících skupin v normoxii a v hypoxii byla koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu u hypoxických skupin signifikantně vyšší (Obr. 4.8).

Podání BH4 rovněž zvyšuje produkci NO v plicích. Při srovnání odpovídajících skupin s BH4 a bez BH4 (v hypoxii i normoxii) byla koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu signifikantně vyšší u skupin, kterým byl podáván BH4 (Obr. 4.8).

L-NIL téměř blokuje produkci NO v plicích. Po podání L-NIL byla koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu u obou skupin zanedbatelná (Obr. 4.8).

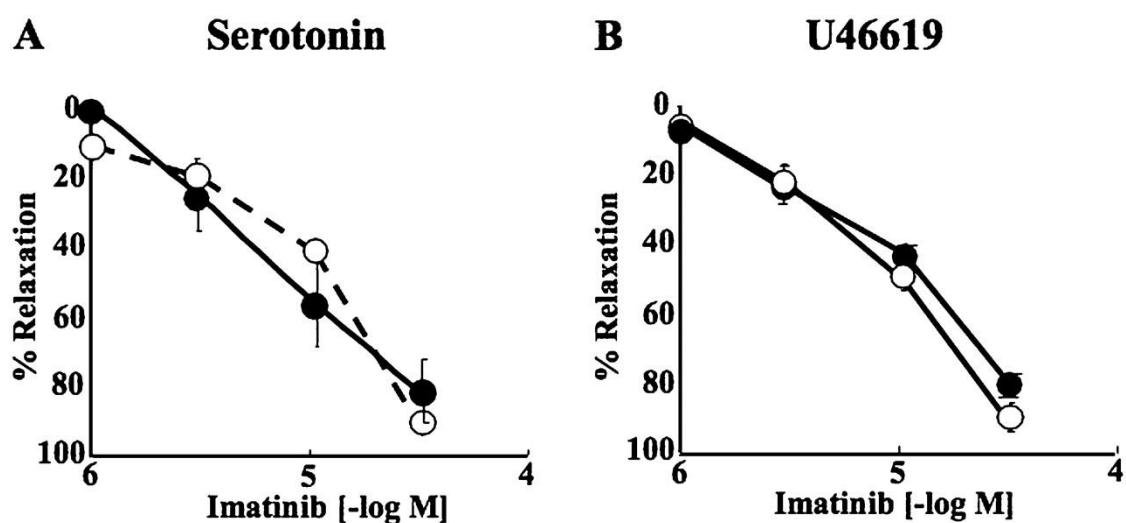


Obr. 4.8 – Měření koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu. *** $p < 0.0001$, # $p < 0.0001$ ve srovnání se skupinami bez L-NIL.

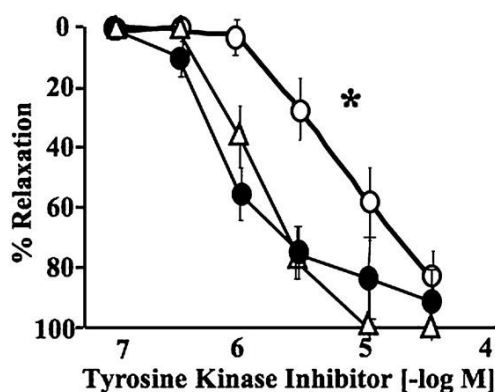
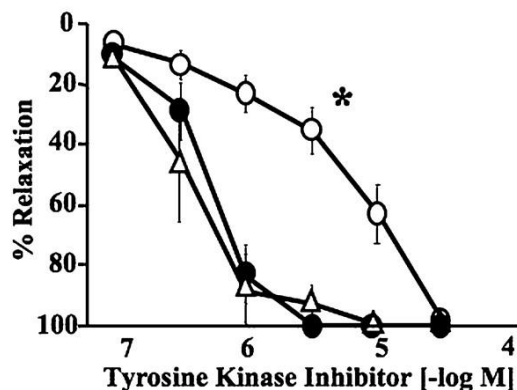
Účinek inhibitorů tyrosinkináz na vazokonstrikci plicních cév

Imatinib inhibuje vazokonstrikci plicních cév způsobenou serotoninem a U46619. Tento účinek nebyl závislý na přítomnosti endotelu (Obr. 4.9).

Všechny tři testované inhibitory tyrosinkináz (imatinib, nilotinib a sorafenib) signifikantně inhibovaly kontrakci kroužků z plicnic normoxických potkanů indukovanou pomocí U46619 při inhibované NO syntáze (L-NNA). U kroužků z plicnic zvířat s plicní hypertenzí (SU5416/hypoxie/normoxie) způsobila inhibice NO syntázy sama o sobě významnou kontrakci. Všechny tři inhibitory tyrosinkináz v závislosti na koncentraci tuto kontrakci signifikantně inhibovaly (a ve vyšších koncentracích zcela zablokovaly). Relaxační účinek nilotinibu a sorafenibu byl výraznější než u imatinibu (Obr. 4.10).



Obr. 4.9 – Vazodilatační efekt imatinibu v izolovaných plicnicích s intaktním (černá kolečka) a odstraněným (bílá kolečka) endotelem prekontrahovaných (A) serotoninem a (B) U46619.

A. Normotensive**B. Hypertensive**

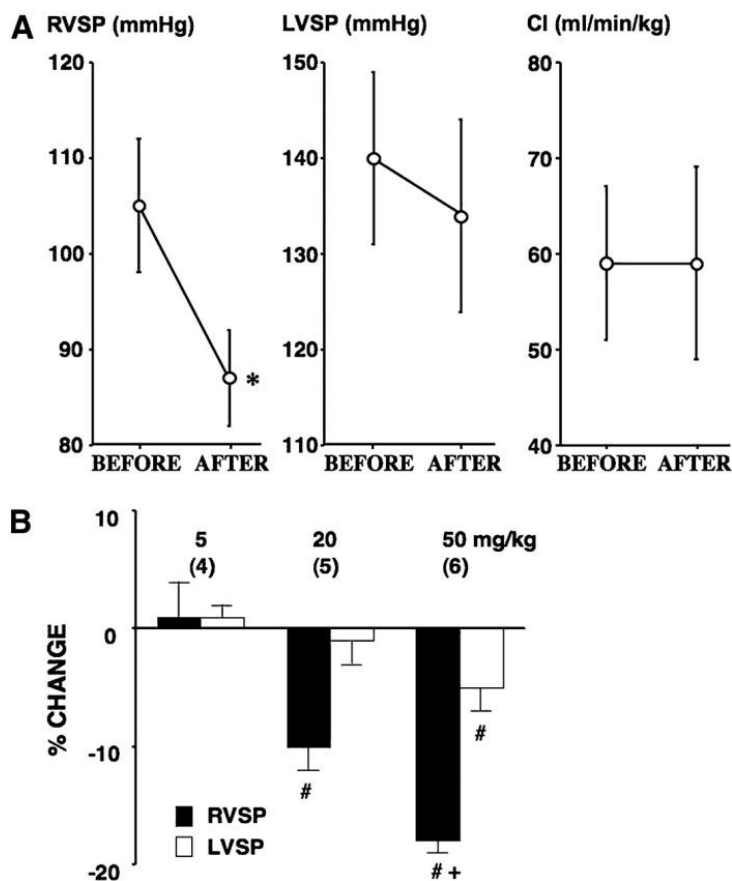
Obr. 4.10 – Vazodilatační efekt imatinibu (bílá kolečka), nilotinibu (černá kolečka) a sorafenibu (bílé trojúhelníčky) v izolovaných plicních (A) kontrolních zvířat prekontrahovaných U46619 a (B) zvířat ze skupiny SU5416/hypoxie/normoxie prekontrahovaných L-NNA.

* $p < 0.001$ ve srovnání s nilotinibem a sorafenibem.

Hemodynamické účinky imatinibu u katetrizovaných potkanů s plicní hypertenzí

U potkanů ze skupiny SU5416/hypoxie/normoxie se vyvinula významná plicní hypertenze. Tato zvířata měla vysoký systolický tlak v pravé komoře a významně snížený srdeční index. Systolický tlak v levé komoře a srdeční frekvence se nelišily od kontrolních zvířat. Potkani s plicní hypertenzí měli významnou hypertrofii pravé komory (poměr RV/LV+S byl $0,55 \pm 0,02$ versus $0,20 \pm 0,02$ u kontrol, $n = 11$ a 4 , $P < 0,001$).

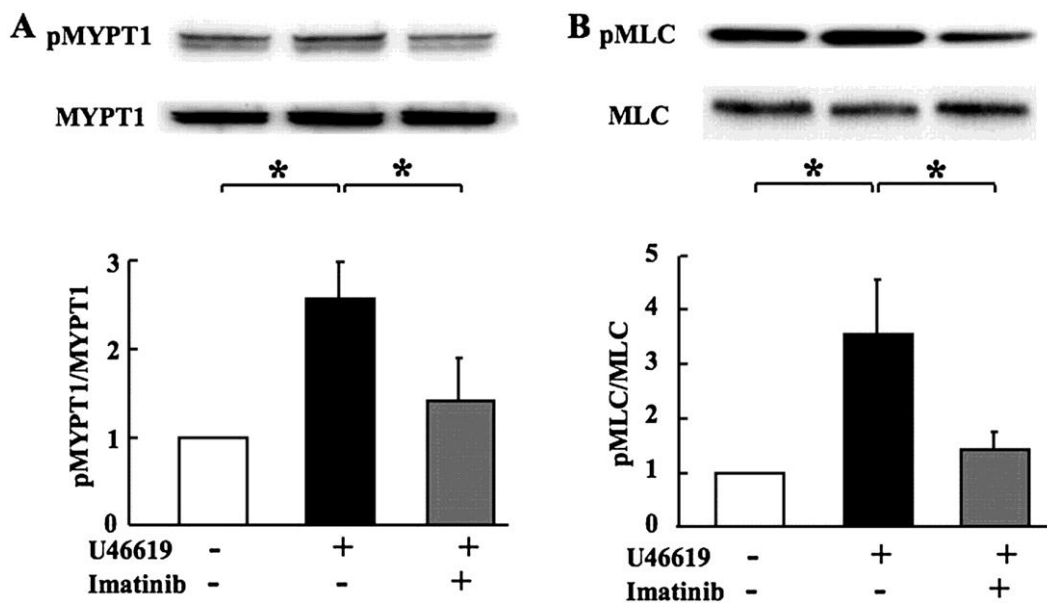
U zvířat s plicní hypertenzí byly testovány akutní hemodynamické účinky imatinibu. Imatinib v dávce 50 mg/kg významně snížil vysoký tlak v pravé komoře. Účinky na tlak v levé komoře, srdeční frekvenci a srdeční index byly malé a nesignifikantní. Účinek imatinibu na tlak v pravé komoře v dávce 10 mg/kg byl nižší, ale stále signifikantní, a v dávce 5 mg/kg nebyl signifikantní (Obr. 4.11).



Obr. 4.11 – Vliv imatinibu na hemodynamické parametry potkanů SU5416/hypoxie/normoxie s plicní hypertenzí. (A) Vliv imatinibu (50 mg/kg) na systolický tlak v pravé komoře (RVSP), systolický tlak v levé komoře (LVSP) a srdeční index (CI). (B) Vliv imatinibu (5, 20 a 50 mg/kg) na systolický tlak v pravé komoře (černé sloupce) a systolický tlak v levé komoře (bílé sloupce). * $p < 0.05$ ve srovnání s hodnotou před, # $p < 0.05$ ve srovnání s klidovou hodnotou, + $p < 0.05$ ve srovnání s 20 mg/kg.

Účinek imatinibu na aktivitu MLCP a fosforylaci MLC

Podání U44619 snížilo aktivitu MLCP (zvýšilo fosforylaci její regulační podjednotky MYPT1 na Thr850) a také zvýšilo fosforylaci MLC. Imatinib signifikantně snížil fosforylaci MYPT1 a MLC indukovanou pomocí U44619 (Obr. 4.12).



Obr. 4.12 – Vliv imatinibu (30 μ M) na zvýšení fosforylace regulační podjednotky (A) fosfatázy lehkého řetězce myozinu (MYPT1) a (B) lehkého řetězce myozinu (MLC) u normoxických zvířat. Fosforylace byla indukována pomocí U46619 (100 nM). V horní části jsou znázorněny imunoblotty fosforylovaných (p) a celkových množství MYPT1 a MLC. V dolní části jsou znázorněny poměry pMYPT1/MYPT1 a pMLC/MLC. * $p < 0.05$

5. DISKUSE

Rho kinázy

Naše výsledky potvrdily inhibiční účinek fasudilu na plicní vazokonstrikci vyvolanou hypoxií a angiotensinem II u normoxických potkanů. Tento výsledek je ve shodě s předchozími studiemi, kde bylo ukázáno, že aktivace Rho kináz se podílí na plicní vazokonstrikci vyvolané hypoxií (Aaronson et al., 2006) a angiotensinem II (Ichiki, 2002). Podání fasudilu do perfuzního roztoku neovlivnilo bazální perfuzní tlak. Lze tedy předpokládat, že za normálních podmínek (normoxie) je senzitivita k vápníku relativně nízká a k aktivaci Rho kináz dochází až při vazokonstrikčním stimulu.

Účinek fasudilu na vývoj hypoxické plicní hypertenze jsme testovali na potkanech vystavených hypoxii po dobu 7 dnů (normobarická hypoxická komora, 10% O₂). U tohoto modelu vzniká plicní hypertenze během 10 – 14 dnů a poté již dále neprogreduje (Herget et al., 1978; Reeves a Herget, 1984). Pro zhodnocení akutního podání fasudilu i jeho chronického podávání během doby hypoxické expozice na plicní hemodynamické parametry jsme zvolili hodnocení vztahu P/Q na preparátu izolovaných perfundovaných plic.

Na závislosti P/Q můžeme hodnotit dva parametry (Obr. 3.1, str. 25) – směrnici neboli sklon přímky (slope) a hodnotu průsečíku přímky s osou perfuzního tlaku (intercept). Podle Starlingova rezistorového modelu plicní cirkulace (Permutt a Riley, 1963) můžeme zjednodušeně říci, že hodnota slope odpovídá odporu, který klade plicní cévní řečiště zvyšujícímu se průtoku. Vyšší hodnota slope může být dána sníženou poddajností plicních cév nebo úbytkem celkové plochy jejich průřezu. Hodnota intercept udává tlak, při kterém je cévou nulový průtok, a můžeme ji tedy chápat jako kritický otevírací tlak plicních cév. Tento tlak koreluje s bazálním tonem plicních cév.

Akutní inhibice Rho kináz fasudilem signifikantně neovlivnila parametry závislosti P/Q u kontrolní normoxické skupiny. Fasudil způsobil pouze drobný pokles hodnoty intercept, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný. Tento náález podporuje hypotézu, že v normoxii nedochází za klidových podmínek k aktivaci Rho kináz.

Akutní inhibice Rho kináz fasudilem u hypoxické skupiny způsobila signifikantní pokles hodnoty intercept. Můžeme tedy říci, že fasudil měl vazodilatační účinek a způsobil snížení bazálního tonu plicních cév (snížení jejich kritického otevíracího tlaku). Tento výsledek souhlasí s publikovanými studiemi, kde fasudil účinkoval jako plicní vazodilatans u zvířat s plicní hypertenzí (McMurtry et al., 2003; McNamara et al., 2008; Nagaoka et al., 2005; Nagaoka et al., 2004). Aktivace Rho kináz se podle těchto výsledků podílí na zvýšeném klidovém bazálním tonu plicních cév u zvířat s hypoxickou plicní hypertenzí.

Chronická inhibice Rho kináz fasudilem během sedmidenního vystavení hypoxii způsobila signifikantní pokles směrnice závislosti P/Q (slope). Fasudil tedy při chronické hypoxii zmírnil vzestup odporu, který kladou plicní cévy zvyšujícímu se průtoku. Účinek může být dán zabráněním snižování jejich poddajnosti nebo zabráněním zmenšování jejich lumen – k oběma těmito procesům v patogenezi hypoxické plicní hypertenze dochází (Stenmark et al., 2006). Tento výsledek je ve shodě s předchozími studiemi, které udávají zpomalení vývoje plicní hypertenze při chronické inhibici Rho kináz (Abe et al., 2006; Fagan et al., 2004; Ziino et al., 2009). Bylo také popsáno, že Rho kinázy se při chronické hypoxii podílí nejen na zvýšeném tonu plicních cév, ale také hrají roli jako mediátor jejich strukturální přestavby (Oka et al., 2008). Rho kináza se uplatňuje při migraci a proliferaci různých typů buněk včetně cévních hladkých svalových buněk (Gerthoffer, 2007; Liu et al., 2004). Je tedy pravděpodobné, že příznivý vliv chronického podávání fasudilu při chronické hypoxii je dán nejen jeho vazodilatačním účinkem, ale také inhibicí těchto mechanismů.

Publikované výsledky ukazují příznivé účinky inhibitorů Rho kináz i u lidí s plicní hypertenzí. Podobně jako ve zvířecích modelech mají i u člověka inhibitory Rho kináz vazodilatační efekt na izolované plicní cévy (Yamagata et al., 2000). Možné roli Rho kináz při plicní hypertenzi nasvědčuje i jejich zvýšená aktivita v plicní tkáni a v cirkulujících neutrofilech (Do e et al., 2009).

S akutním podáním inhibitorů Rho kináz u pacientů s plicní hypertenzí bylo provedeno několik klinických studií. Fasudil byl aplikován intravenózně (Fukumoto et al., 2005; Ishikura et al., 2006; Li et al., 2009) nebo inhalačně (Fujita et al., 2010). Změna hemodynamických parametrů byla měřena při katetrizaci. Ve všech těchto studiích fasudil snížil plicní cévní rezistenci. Selektivita tohoto účinku na plicní oběh byla různá, v některých ze studií fasudil snížil i systémovou rezistenci, ale v žádné z těchto prací neměl signifikantní vliv na systémový tlak. Relativně selektivní účinek na plicní cirkulaci měl fasudil u dětí s plicní hypertenzí na podkladě levoprávého zkratu (Li et al., 2009) a zcela selektivní při inhalačním podání (Fujita et al., 2010).

Nedávno byly publikovány první výsledky chronické léčby plicní hypertenze pomocí inhibitorů Rho kináz u lidí (Fukumoto et al., 2013). Tyto výsledky poukazují na významný vliv Rho kináz v patogenezi plicní hypertenze u člověka a inhibitory Rho kináz by mohly být slibným lékem k léčbě této choroby.

Rozpřažení NO syntázy

Naše výsledky potvrdily inhibiční účinek BH4 na HPV, což je ve shodě s publikovanými výsledky (Francis et al., 2010). BH4 je nutným kofaktorem k činnosti NO syntázy a zdá se tedy, že exogenním podáním BH4 můžeme docílit spřažení NO syntázy a zvýšit produkci NO (Francis et al., 2010). Toto zvýšení tvorby NO by potom inhibovalo plicní vazokonstrikci.

Zásadním výsledkem je menší vazodilatační účinek BH4 u zvířat vystavených 4 dnům hypoxie oproti kontrolním. V experimentech na izolovaných plicích BH4 ve stejné koncentraci (5 µg/ml) u normoxické skupiny signifikantně inhiboval HPV, ale u skupiny hypoxické signifikantně HPV neovlivnil. Pro menší účinek BH4 na hypoxické plíce je několik možných vysvětlení. Může být dán menším zvýšením produkce NO vlivem BH4 u zvířat vystavených chronické hypoxii. Může být také dán sníženou plicní reaktivitou na hypoxii u chronicky hypoxických zvířat (McMurtry et al., 1978). Toto vysvětlení však považujeme za nepravděpodobné, protože velikost HPV po zablokování NO syntázy pomocí L-NAME se u normoxických a hypoxických plic nelišila.

Rozdílnou reaktivitu plicních cév normoxických a chronicky hypoxických zvířat také potvrzují rozdíly v dynamice vazodilatace způsobené podáním BH4. Vazodilatace izolovaných cév byla u zvířat vystavených chronické hypoxii rychlejší. Je známo, že akutní hypoxie zpomaluje rychlost vazodilatace (Voelkel et al., 1981), prací zabývajících se dynamikou vazodilatace je však v literatuře minimum a o rychlosti vazodilatace u chronicky hypoxických plicních cév nemáme jasné informace. Je tedy možné, že vazodilatace je u chronicky hypoxických cév obecně rychlejší a tento rozdíl není specifický pouze pro BH4.

Předpokládáme, že nižší vazodilatační účinek BH4 u hypoxických plic je dán menším zvýšením produkce NO. Rovnováha mezi produkcí NO a superoxidu je určována zejména poměrem BH4/BH2 (Crabtree et al., 2009). BH4 podaný exogenně může zvýšit produkci NO

právě zvýšením poměru BH4/BH2. Díky zvýšenému poměru BH4/BH2 může více NO syntáz přejít do spřaženého stavu, což zvýší tvorbu NO a sníží tvorbu superoxidu.

Menší zvýšení produkce NO vlivem BH4 u hypoxických plic by mohlo být vysvětleno jiným počátečním poměrem BH4/BH2. Pokud je tento poměr u hypoxických plic primárně nižší, stejná dávka BH4 podaná exogenně ho nemusí zvýšit do takové míry jako u normoxických plic.

Hlavní příčinou sníženého poměru BH4/BH2 je oxidační stres. Působením oxidačního stresu se BH4 oxiduje na BH2, což snižuje koncentraci BH4 a zvyšuje koncentraci BH2. Bylo popsáno, že počáteční fáze vystavení chronické hypoxii je charakterizována zvýšením oxidačního stresu (Hampl et al., 2006; Herget, 2000; Nozik-Grayck et al., 2007). Podle nedávných výsledků naší pracovní skupiny je nejvyšší produkce ROS právě během prvních dnů hypoxie, kdy se současně zvyšuje i produkce NO (Hodyc et al., 2012). Na základě těchto výsledků jsme také volili dobu vystavení hypoxii 4 dny. BH4 může být nejsnadněji oxidován na BH2 působením peroxynitritu, který vzniká reakcí superoxidu s NO (Kuzkaya et al., 2003).

Domníváme se, že zvýšený oxidační stres v počátečním stadiu chronické hypoxie snižuje poměr BH4/BH2 a způsobuje rozprášení NO syntázy. Tento koncept je v souladu s publikovanými výsledky, že vyšší endoteliální koncentrace BH4 brání vývoji hypoxické plicní hypertenze (Khoo et al., 2005). Tyto výsledky naznačují, že při chronické hypoxii může docházet k oxidaci BH4 a rozprášení NO syntázy.

Koncept, že rozprášení NO syntázy se uplatňuje v patogenezi hypoxické plicní hypertenze, je navíc ve shodě s tím, že inhibice angiotensin konvertujícího enzymu brání vývoji HPH (Herget et al., 1996). Bylo popsáno, že angiotensin II způsobuje rozprášení NO syntázy (Chalupsky a Cai, 2005).

Poněkud protichůdné jsou však naše výsledky z měření koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu, kde sice BH4 zvýšil produkci NO, ale nebyl zde signifikantní rozdíl v tomto zvýšení mezi hypoxickými a normoxickými zvířaty. Jako vysvětlení se nabízí různá role různých izoform NO syntázy. Téměř úplné zablokování tvorby NO ve vydechovaném vzduchu pomocí L-NIL nasvědčuje tomu, že prakticky jediným zdrojem vydechovaného NO je inducibilní NO syntáza (iNOS). Tomu nasvědčují i naše předchozí výsledky (Hampl et al., 2006) a měření u lidí, kde specifický inhibitor iNOS zablokoval produkci NO ve vydechovaném vzduchu u zdravých dobrovolníků (Hansel et al., 2003).

V našich experimentech in vitro se však pravděpodobně uplatňovaly všechny izoformy NO syntázy, tedy zejména také endoteliální NO syntáza (eNOS). Je tedy možné, že rozdíly v odpovědi hypoxických a normoxických plic na podání BH4 jsou dány zejména eNOS a že při chronické hypoxii dochází k rozpřažení zejména tohoto izoenzymu. Většina literatury se ohledně rozpřažení NO syntázy zaměřuje pouze na eNOS a rozdílné role jednotlivých izoform nebyly detailně posuzovány.

Podle měření NO ve vydechovaném vzduchu také chronická hypoxie sama o sobě zvyšuje produkci NO (u skupiny vystavené 4 dnům hypoxie zde byl signifikantní rozdíl oproti kontrolám). Tento nálezn je typický pro počáteční stadium vystavení hypoxii a souhlasí s předchozími výsledky naší skupiny (Hampl et al., 2006; Hodyc et al., 2012). Zvýšená aktivita a exprese NO syntázy na počátku chronické hypoxie byla popsána v mnoha studiích (Hampl a Herget, 2000). To nemusí být nutně v rozporu s myšlenkou rozpřažení NO syntázy. Stav rozpřažení NO syntázy musíme chápat spíše jako poměrné zastoupení rozpřažených NO syntáz v jejich celkovém počtu. I při vyšším poměru rozpřažených NO syntáz tedy může být celková produkce NO zvýšená oproti normoxii, pokud je vyšší celková aktivita a počet NO syntáz. Navíc, jak bylo diskutováno výše, za NO ve vydechovaném vzduchu je zodpovědná

prakticky pouze iNOS a z těchto výsledků nemůžeme určit skutečnou celkovou produkci NO v plicích.

Jsme si vědomi toho, že všechny výsledky, které poukazují na možnou roli rozpřažení NO syntázy při HPH, jsou nepřímé (měření inhibice HPV nebo měření NO ve vydechovaném vzduchu). Bohužel jsme v době provádění experimentů neměli k dispozici metody na přímé měření koncentrací BH4 a BH2 (a tedy poměru BH4/BH2) v tkáních. Také jsme neměřili ROS nebo redoxní stav tkání při chronické hypoxii. Role ROS při chronické hypoxii je však poměrně podrobně zdokumentována v literatuře (Nozik-Grayck et al., 2007; Tabima et al., 2012).

Koncept rozpřažení NO syntázy při hypoxické plicní hypertenzi podporují výsledky několika dalších studií na zvířecích modelech (Dubois et al., 2013; Khoo et al., 2005). Tento mechanismus by podle našich i dalších výsledků mohl být důležitý v patogenezi hypoxické plicní hypertenze, stejně jako u dalších chorob spojených s endoteliální dysfunkcí (Gielis et al., 2011). Farmakologický zásah do mechanismů syntézy a recyklace BH4 zaměřený na zvýšení poměru BH4/BH2 a spřažení NO syntázy by tedy mohl být důležitou terapeutickou možností nejen u léčby plicní hypertenze.

Inhibitory tyrosinkináz

Podle našich výsledků jsou inhibitory tyrosinkináz (imatinib, nilotinib a sorafenib) silná plicní vazodilatancia. Všechny tři způsobily v závislosti na své koncentraci relaxaci (ve vyšších koncentracích kompletní relaxaci) plicnic izolovaných z normotenzních potkanů i potkanů s plicní hypertenzí vystaveným modelu SU5416/hypoxie/normoxie. Tento vazodilatační účinek byl nezávislý na endotelu a byl zprostředkován aktivací MLCP (vápníkovou desenzitizací cévních hladných svalových buněk). U potkanů s těžkou plicní hypertenzí navíc akutní intravenózní podání imatinibu snížilo tlak v pravé komoře bez výrazných účinků na systémový tlak nebo srdeční výdej.

Imatinib je schváleným lékem používaným k léčbě chronické myeloidní leukémie a gastrointestinálních stromálních tumorů (Cohen et al., 2002; Dagher et al., 2002). V nízkých koncentracích (kolem 1 μM) inhibuje receptor destičkového růstového faktoru (PDGFR), c-Abelsonovu tyrosinkinázu (c-Abl) a c-kit. Navíc může ve vyšších koncentracích inhibovat další kinázy, jako např. receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR), kinázy rodiny Src a proteinkinázu C (PKC) (Deininger et al., 2005; Patterson et al., 2006). Imatinib podávaný ve vysokých dávkách zmírnil plicní hypertenzi indukovanou hypoxií a monocrotalinem u myši (Klein et al., 2008; Schermuly et al., 2005). Zdá se, že by mohl být slibným lékem pro léčbu plicní hypertenze i u lidí (Ghofrani et al., 2005).

Předpokládá se, že příznivý účinek imatinibu při plicní hypertenzi je zprostředkován inhibicí PDGFR a buněčné proliferace (Klein et al., 2008; Schermuly et al., 2005). Na vazodilatačním účinku imatinibu se ale mohou podílet také další mechanismy: (1) inhibice elevace $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zprostředkované přes PDGFR (Hughes, 1995), (2) inhibice dalších kináz (EGFR, Src, PKC), které regulují $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a senzitivitu k vápníku (Fernandez-Patron, 2007; Knock et al., 2008), a (3) inhibice polymerizace aktinu zprostředkované c-Abl (Tang a Anfinogenova, 2008).

Podle našich výsledků imatinib zcela zrušil vazokonstrikci plicnic normálních potkanů způsobenou agonisty. Tento účinek byl nezávislý na přítomnosti endotelu. Prekontrakce pomocí U46619 způsobila zvýšení fosforylace MLC a MYPT1 (regulační podjednotky MLCP), což je ve shodě s předchozími výsledky (Wilson et al., 2005). Následné podání imatinibu nejen snížilo fosforylaci MLC, ale také snížilo fosforylaci MYPT1. To poukazuje na pravděpodobné uplatnění vápníkové desenzitizace (zprostředkované defosforylací MYPT1 a aktivací MLCP) při vazodilatačním účinku imatinibu.

Přesné mechanismy vazodilatačního efektu imatinibu však nejsou objasněny. Je možné, že tento účinek je zprostředkován dalšími kinázami, které může imatinib blokovat ve vyšších koncentracích (EGFR, Src, PKC), spíše než kinázami, na které je zacílen jeho primární účinek (PDGFR, c-kit, c-Abl). Tuto teorii by podporovalo zjištění, že v nižších koncentracích (1 a 3 μM) byl vazodilatační účinek imatinibu malý. V těchto koncentracích imatinib inhibuje pouze své primární cíle (Ito et al., 1994).

Výsledky z měření hemodynamických parametrů při katetrizaci *in vivo* jsou podobné jako z pokusů *in vitro*. Imatinib signifikantně snížil systolický tlak v pravé komoře u potkanů s plicní hypertenzí (SU5416/hypoxie/normoxie) ve vysokých dávkách (20 a 50 mg/kg), ale ne v nízké dávce (5 mg/kg). Tato nízká dávka je podobná dávce běžně používané k léčbě leukémie (400 mg/den) a také v současných klinických studiích u pacientů s plicní hypertenzí. Imatinib ve vysoké dávce (50 mg/kg) měl dobrý efekt při chronické léčbě plicní hypertenze ve zvířecích modelech (Klein et al., 2008; Pankey et al., 2013; Schermuly et al., 2005). Ve stejných studiích neměly malé dávky imatinibu (1 a 10 mg/kg) žádný významný účinek.

Celkově z těchto poznatků vyplývá, že pro efektivní vazodilatační účinek imatinibu je třeba vysokých koncentrací, vyšších než běžně používaných k inhibici hlavních cílových kináz. Podobně tomu nejspíše bude i při jeho příznivém účinku na chronickou plicní hypertenzi.

Pokud bude efektivita imatinibu stejná i u člověka, lze se domnívat, že v klinických studiích s nižšími dávkami (400 mg/den) nemusí mít imatinib takový účinek, jak se původně předpokládalo. Některé výsledky již toto prokazují – imatinib v malé dávce signifikantně neovlivnil vzdálenost v šestiminutovém testu chůze ani tlak v plicnici (Ghofrani et al., 2010). Vysoké dávky imatinibu u člověka jsou problematické kvůli jeho nežádoucím účinkům (Kerkela et al., 2006).

Potenciálně důležitým výsledkem je, že účinek imatinibu na tlak u potkanů s těžkou plicní hypertenzí je relativně selektivní na plicní cévní řečiště. Přesný mechanismus vazodilatačního účinku imatinibu není jasný, ale možným vysvětlením by bylo snížení senzitivity k vápníku inhibicí Rho kinázové dráhy. Při plicní hypertenzi je Rho kinázová dráha aktivována v hypertenzních plicních cévách, ale ne v normotenzních systémových cévách.

Testovali jsme také vazodilatační účinky dalších dvou inhibitorů tyrosinkináz: nilotinibu – inhibitoru PDGFR a c-Abl (Deremer et al., 2008) a sorafenibu – inhibitoru PDGF, VEGFR a také serin/threoninkináz Raf-1 a b-Raf (Wilhelm et al., 2006). Vazodilatační účinek těchto dvou léků na prekontrahované normotenzní a hypertenzní plicnice byl ještě vyšší než účinek imatinibu. Relaxace způsobená všemi třemi inhibitory byla alespoň do velké míry nezávislá na NO. Přesný mechanismus vazodilatačního zůstává nejasný. Tyto výsledky potvrzují naši hypotézu, že inhibitory tyrosinkináz jsou účinná plicní vazodilatancia a mohly by být efektivními léky pro léčbu plicní hypertenze.

6. ZÁVĚR

Tato práce se zabývá mechanismy, které ovlivňují reaktivitu plicních cév na hypoxii, a soustředí se na regulaci senzitivity cévních hladkých svalových buněk k vápníku. Zaměřuje se na tři základní dráhy, které senzitivitu k vápníku mohou ovlivňovat – na Rho kinázovou dráhu, ovlivnění produkce oxidu dusnatého (rozpřažení NO syntázy) a účinek inhibitorů tyrosinkináz. Tyto dráhy byly zkoumány za normálních podmínek a dále na zvířecích modelech plicní hypertenze (chronická hypoxie, model SU5416/hypoxie/normoxie).

Uvedené výsledky potvrzují naše hypotézy, že při hypoxické plicní vazokonstrikci a při hypoxické plicní hypertenzi dochází ke zvýšení senzitivity k vápníku. Tuto zvýšenou senzitivitu je možné ovlivnit zásahem do zkoumaných mechanismů – pomocí inhibitorů Rho kináz či inhibitorů tyrosinkináz. Obě tyto skupiny látek mají silné plicní vazodilatační účinky a při dlouhodobém podávání zpomalují progresi hypoxické plicní hypertenze.

Naše výsledky rovněž podporují hypotézu, že při vývoji hypoxické plicní hypertenze může docházet k rozpřažení NO syntázy, k následné poruše produkce NO a současnému zvýšení radikálového poškození plicních cév. NO je důležitou vazodilatační látkou a může senzitivitu k vápníku naopak snižovat. Zhoršení produkce NO při chronické hypoxii se tedy také může podílet na vzestupu kalciové senzitivity. Pomocí zvýšení koncentrace kofaktoru NO syntázy tetrahydrobiopterinu (zvýšení poměru BH₄/BH₂) lze zvýšit tvorbu NO a nejspíše docílit opětovného spřažení NO syntázy.

Regulace senzitivity hladkých svalových buněk k intracelulární koncentraci vápníku je velmi důležitým mechanismem v regulaci vaskulárního tonu. Zásah do tohoto mechanismu přináší možnosti terapeutického ovlivnění plicní hypertenze.

7. ABSTRAKT

Hypoxická plicní vazokonstrikce (HPV) je fyziologickým mechanismem, který zajišťuje optimální okysličování krve v plicích. Dlouhodobá hypoxie však způsobuje vznik hypoxické plicní hypertenze (HPH). Na patogenezi HPH se podílí poškození cév reaktivními sloučeninami kyslíku (ROS). Oxidační stres může způsobit rozpřažení NO syntázy a následnou produkci superoxidu místo NO.

Vazokonstrikce plicních cév je umožněna zvýšením intracelulární koncentrace Ca^{2+} v hladkých svalových buňkách v cévní stěně. Cévní tonus je však možno regulovat i beze změn koncentrace Ca^{2+} , a to změnami senzitivity hladkých svalových buněk k vápníku. Zvýšení senzitivity k Ca^{2+} se uplatňuje při HPV i v patogenezi HPH. Tato práce se zaměřuje na tři mechanismy, které by mohly ovlivnit zvýšenou senzitivitu k vápníku při HPV a HPH: (1) inhibice Rho kináz, (2) snaha o spřažení NO syntázy a (3) vazodilatační účinek inhibitorů tyrosinkináz.

Indukce plicní hypertenze byla provedena umístěním laboratorních potkanů do normobarické hypoxické komory (10% O_2) nebo kombinací hypoxie a blokády receptoru vaskulárního endoteliálního růstového faktoru.

(1) Vliv akutní a chronické inhibice Rho kináz fasudilem byl studován na závislosti perfuzního tlaku na průtoku (P/Q) v izolovaných perfundovaných plicích. Akutní inhibice Rho kináz u zvířat s HPH snížila bazální tonus plicních cév. Chronická inhibice Rho kináz během hypoxie podle tohoto modelu snížila vzestup plicní cévní rezistence.

(2) Vliv exogenního podání tetrahydrobiopterinu (BH_4 , kofaktor NO syntázy) byl studován na izolovaných perfundovaných plicích, izolovaných plicních cévách a na koncentraci NO ve vydechovaném vzduchu u živých zvířat. Podání BH_4 mělo vazodilatační účinek, který byl

vyšší u kontrolních než u hypoxických zvířat. BH4 zvýšil koncentraci NO ve vydechovaném vzduchu. Tyto účinky mohou být zablokovány inhibitory NO syntázy.

(3) Inhibitory tyrosinkináz (imatinib, nilotinib, sorafenib) měly silné vazodilatační účinky na normální i hypertenzní izolované plicnice. Na jejich efektu se podílí aktivace fosfatázy lehkého řetězce myozinu (snížení senzitivity k vápníku). Akutní podání imatinibu snížilo tlak v pravé komoře bez velkého vlivu na systémový tlak u živých potkanů s plicní hypertenzí.

Zvýšená senzitivita k vápníku při chronické hypoxii může být ovlivněna Rho kinázovými a tyrosinkinázovými inhibitory. Obě tyto skupiny látek mají silné plicní vazodilatační účinky. Podání BH4 zvyšuje produkci NO. Příčinou menšího účinku u hypoxických zvířat může být rozpřažení NO syntázy při chronické hypoxii. Zhoršení produkce NO při chronické hypoxii se také může podílet na vzestupu kalciové senzitivity.

Regulace senzitivity hladkých svalových buněk k intracelulární koncentraci vápníku je důležitým mechanismem v regulaci vaskulárního tonu.

ABSTRACT

Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) is a physiological mechanism that maintains optimal oxygenation of blood in the lungs. However, chronic hypoxia causes hypoxic pulmonary hypertension (HPH). Increased reactive oxygen species (ROS) participate in the pathogenesis of HPH. Oxidative stress can cause NO synthase uncoupling and subsequent production of superoxide instead of NO.

Increase in intracellular Ca^{2+} concentration in pulmonary smooth muscle cells is required for pulmonary vasoconstriction. However, vessel tone can also be regulated by vascular smooth muscle cells' calcium sensitivity (without Ca^{2+} concentration changes). Increase of calcium sensitivity plays a role in HPV and HPH. This study focuses on three mechanisms to influence the increased calcium sensitivity in HPV and HPH: (1) Rho kinase inhibition, (2) effort to re-couple NO synthase, and (3) vasorelaxant effect of tyrosine kinase inhibitors.

Normobaric hypoxic chamber (10% O_2) or the combination of hypoxia and vascular endothelial growth factor receptor blockade was used to induce pulmonary hypertension in rats.

(1) The effect of acute and chronic Rho kinase inhibition was studied on pressure-flow relationship (P/Q) in isolated perfused lungs. Acute Rho kinase inhibition decreased the basal tone of pulmonary vessels in HPH animals. Chronic Rho kinase inhibition during hypoxia lowered the increase in pulmonary vascular resistance according to this model.

(2) The effect of exogenous tetrahydrobiopterin administration (BH_4 , NO synthase cofactor) was studied in isolated perfused lungs, isolated pulmonary vessels, and on exhaled NO concentrations in live animals. BH_4 had a vasorelaxant effect that was bigger in controls than in hypoxic animals. BH_4 also increased exhaled NO concentrations. These effects were blocked by NO synthase inhibitors.

(3) Tyrosine kinase inhibitors had potent vasorelaxant effects on both normal and hypertensive isolated pulmonary arteries. Activation of myosin light chain phosphatase (calcium desensitisation) plays a role in these effects. Acute imatinib administration reduced right ventricle pressure in live rats with pulmonary hypertension.

Increased calcium sensitivity in chronic hypoxia can be influenced by Rho kinase inhibitors and tyrosine kinase inhibitors. Both have potent pulmonary vasorelaxant effects.

BH4 administration increases NO production. The smaller increase in NO production in hypoxic lungs can be due to NO synthase uncoupling in chronic hypoxia. Impaired NO production in chronic hypoxia can participate in calcium sensitivity increase.

The regulation of vascular smooth muscle cells' calcium sensitivity is an important mechanism in vascular tone regulation.

8. LITERATURA

- Aaronson PI, Robertson TP, Knock GA, Becker S, Lewis TH, Snetkov V a Ward JP. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies. *J Physiol*. 2006, **570**(Pt 1), 53-58.
- Abe K, Tawara S, Oi K, Hizume T, Uwatoku T, Fukumoto Y, Kaibuchi K a Shimokawa H. Long-term inhibition of Rho-kinase ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2006, **48**(6), 280-285.
- Antoniades C, Shirodaria C, Crabtree M, Rinze R, Alp N, Cunningham C, Diesch J, Tousoulis D, Stefanadis C, Leeson P, Ratnatunga C, Pillai R a Channon KM. Altered Plasma Versus Vascular Biopterins in Human Atherosclerosis Reveal Relationships Between Endothelial Nitric Oxide Synthase Coupling, Endothelial Function, and Inflammation. *Circulation*. 2007, **116**(24), 2851-2859.
- Archer SL, Souil E, Dinh-Xuan AT, Schremmer B, Mercier JC, El Yaagoubi A, Nguyen-Huu L, Reeve HL a Hampl V. Molecular identification of the role of voltage-gated K⁺ channels, Kv1.5 and Kv2.1, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *J Clin Invest*. 1998, **101**(11), 2319-2330.
- Bačáková L, Herget J, Novotná J, Eckhardt A a Lisá V. Adhesion, growth and stress adaptation of vascular smooth muscle cells in cultures on collagen I degraded by matrix metalloproteinase-13. *Ateroskleróza*. 2002, **6**, 155-161.
- Badesch DB, Champion HC, Gomez Sanchez MA, Hoeper MM, Loyd JE, Manes A, McGoon M, Naeije R, Olschewski H, Oudiz RJ a Torbicki A. Diagnosis and Assessment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009, **54**(1_Suppl_S), S55-66.
- Barbieri JT, Riese MJ a Aktories K. Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2002, **18**, 315-344.
- Becker S, Moir LM, Snetkov VA a Aaronson PI. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in intact rat intrapulmonary arteries is not initiated by inhibition of Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007, **293**(4), L982-990.
- Beckman JS a Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996, **271**(5 Pt 1), C1424-1437.
- Berridge MJ, Lipp P a Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000, **1**(1), 11-21.
- Blaustein MP a Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev*. 1999, **79**(3), 763-854.
- Bonnet S, Dubuis E, Vandier C, Martin S, Marthan R a Savineau J-P. Reversal of chronic hypoxia-induced alterations in pulmonary artery smooth muscle electromechanical coupling upon air breathing. *Cardiovascular Research*. 2002, **53**(4), 1019-1028.
- Cai S, Khoo J, Mussa S, Alp NJ a Channon KM. Endothelial nitric oxide synthase dysfunction in diabetic mice: importance of tetrahydrobiopterin in eNOS dimerisation. *Diabetologia*. 2005, **48**(9), 1933-1940.
- Casey DB, Badejo AM, Dhaliwal JS, Sikora JL, Fokin A, Golwala NH, Greco AJ, Murthy SN, Nossaman BD, Hyman AL a Kadowitz PJ. Analysis of responses to the Rho-kinase inhibitor Y-27632 in the pulmonary and systemic vascular bed of the rat. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2010, **299**(1), H184-192.
- Cohen MH, Williams G, Johnson JR, Duan J, Gobburu J, Rahman A, Benson K, Leighton J, Kim SK, Wood R, Rothmann M, Chen G, U KM, Staten AM a Pazdur R. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*. 2002, **8**(5), 935-942.

- Cornfield DN, Stevens T, McMurtry IF, Abman SH a Rodman DM. Acute hypoxia causes membrane depolarization and calcium influx in fetal pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1994, **266**(4 Pt 1), L469-475.
- Crabtree MJ, Tatham AL, Al-Wakeel Y, Warrick N, Hale AB, Cai S, Channon KM a Alp NJ. Quantitative Regulation of Intracellular Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) Coupling by Both Tetrahydrobiopterin-eNOS Stoichiometry and Biopterin Redox Status. *Journal of Biological Chemistry.* 2009, **284**(2), 1136-1144.
- Dagher R, Cohen M, Williams G, Rothmann M, Gobburu J, Robbie G, Rahman A, Chen G, Staten A, Griebel D a Pazdur R. Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res.* 2002, **8**(10), 3034-3038.
- Deininger M, Buchdunger E a Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2005, **105**(7), 2640-2653.
- Deremer DL, Ustun C a Natarajan K. Nilotinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Ther.* 2008, **30**(11), 1956-1975.
- Do e Z, Fukumoto Y, Takaki A, Tawara S, Ohashi J, Nakano M, Tada T, Saji K, Sugimura K, Fujita H, Hoshikawa Y, Nawata J, Kondo T a Shimokawa H. Evidence for Rho-kinase activation in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society.* 2009, **73**(9), 1731-1739.
- Dubois M, Delannoy E, Duluc L, Closs E, Li H, Toussaint C, Gadeau AP, Godecke A, Freund-Michel V, Courtois A, Marthan R, Savineau JP a Muller B. Biopterin metabolism and eNOS expression during hypoxic pulmonary hypertension in mice. *PLoS One.* 2013, **8**(11), e82594.
- Eto M, Ohmori T, Suzuki M, Furuya K a Morita F. A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem.* 1995, **118**(6), 1104-1107.
- Euler von VS a Liljestrand G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol. Scand.* 1946, **12**, 301-320.
- Fagan KA, Oka M, Bauer NR, Gebb SA, Ivy DD, Morris KG a McMurtry IF. Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2004, **287**(4), L656-L664.
- Fernandez-Patron C. Therapeutic potential of the epidermal growth factor receptor transactivation in hypertension: a convergent signaling pathway of vascular tone, oxidative stress, and hypertrophic growth downstream of vasoactive G-protein-coupled receptors? *Can J Physiol Pharmacol.* 2007, **85**(1), 97-104.
- Francis BN, Wilkins MR a Zhao L. Tetrahydrobiopterin and the regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *European Respiratory Journal.* 2010, **36**(2), 323-330.
- Fujita H, Fukumoto Y, Saji K, Sugimura K, Demachi J, Nawata J a Shimokawa H. Acute vasodilator effects of inhaled fasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, in patients with pulmonary arterial hypertension. *Heart and Vessels.* 2010, **25**(2), 144-149.
- Fukumoto Y, Matoba T, Ito A, Tanaka H, Kishi T, Hayashidani S, Abe K, Takeshita A a Shimokawa H. Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart.* 2005, **91**(3), 391-392.
- Fukumoto Y, Yamada N, Matsubara H, Mizoguchi M, Uchino K, Yao A, Kihara Y, Kawano M, Watanabe H, Takeda Y, Adachi T, Osanai S, Tanabe N, Inoue T, Kubo A, Ota Y, Fukuda K, Nakano T a Shimokawa H. Double-blind, placebo-controlled clinical trial with a rho-kinase inhibitor in pulmonary arterial hypertension. *Circ J.* 2013, **77**(10), 2619-2625.
- Gelband CH a Gelband H. Ca²⁺ release from intracellular stores is an initial step in hypoxic pulmonary vasoconstriction of rat pulmonary artery resistance vessels. *Circulation.* 1997, **96**(10), 3647-3654.

- Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res.* 2007, **100**(5), 607-621.
- Ghofrani HA, Morrell NW, Hoeper MM, Olschewski H, Peacock AJ, Barst RJ, Shapiro S, Golpon H, Toshner M, Grimminger F a Pascoe S. Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010, **182**(9), 1171-1177.
- Ghofrani HA, Seeger W a Grimminger F. Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2005, **353**(13), 1412-1413.
- Gielis JF, Lin JY, Wingler K, Van Schil PEY, Schmidt HH a Moens AL. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. *Free Radical Biology and Medicine.* 2011, **50**(7), 765-776.
- Groves BM, Reeves JT, Sutton JR, Wagner PD, Cymerman A, Malconian MK, Rock PB, Young PM a Houston CS. Operation Everest II: elevated high-altitude pulmonary resistance unresponsive to oxygen. *Journal of Applied Physiology.* 1987, **63**(2), 521-530.
- Hampl V. [Nitric oxide and regulation of pulmonary vessels]. *Cesk Fysiol.* 2000, **49**(1), 22-29.
- Hampl V, Bibova J, Banasova A, Uhlik J, Mikova D, Hnilickova O, Lachmanova V a Herget J. Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006a, **290**(1), L11-20.
- Hampl V, Bíbová J, Banasová A, Uhlik J, Miková D, Hnilicková O, Lachmanová V a Herget J. Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2006b, **290**(1), L11 -L20.
- Hampl V a Herget J. Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *American Review of Respiratory Disease.* 1990, **142**(3), 619-624.
- Hampl V a Herget J. Role of Nitric Oxide in the Pathogenesis of Chronic Pulmonary Hypertension. *Physiological Reviews.* 2000, **80**(4), 1337-1372.
- Hansel TT, Kharitonov SA, Donnelly LE, Erin EM, Currie MG, Moore WM, Manning PT, Recker DP a Barnes PJ. A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase inhibits exhaled breath nitric oxide in healthy volunteers and asthmatics. *FASEB Journal.* 2003, **17**(10), 1298-1300.
- Harder DR, Madden JA a Dawson C. Hypoxic induction of Ca²⁺-dependent action potentials in small pulmonary arteries of the cat. *J Appl Physiol (1985).* 1985, **59**(5), 1389-1393.
- Herget J. The role of radicals in the development of hypoxic pulmonary hypertension. *Physiol. Res.* 2000, **49**, 2P.
- Herget J a Chovanec M. Isolated perfused murine lung: A well characterized preparation for studying lung vascular function. *Drug Discovery Today. Disease Models.* 2010, **7**(3-4), 131-135.
- Herget J, Pelouch V, Kolár F a Ostádal B. The inhibition of angiotensin converting enzyme attenuates the effects of chronic hypoxia on pulmonary blood vessels in the rat. *Physiological Research.* 1996a, **45**(3), 221-226.
- Herget J, Pelouch V, Kolář F a Ošťádal B. The inhibition of angiotensin converting enzyme attenuates the effects of chronic hypoxia on pulmonary blood vessels. *Phys. Res.* 1996b, **45**, 221 - 226.
- Herget J, Suggett AJ, Leach E a Barer GR. Resolution of pulmonary hypertension and other features induced by chronic hypoxia in rats during complete and intermittent normoxia. *Thorax.* 1978a, **33**468-473.
- Herget J, Suggett AJ, Leach E a Barer GR. Resolution of pulmonary hypertension and other features induced by chronic hypoxia in rats during complete and intermittent normoxia. *Thorax.* 1978b, **33**(4), 468-473.

- Herget J, Wilhelm J, Novotná J, Eckhardt A, Vytášek R, Mrázková L a Ošťádal M. A possible role of oxidant tissue injury in the development of pulmonary hypertension. *Physiol. Res.* 2000, **49**, 493 - 501.
- Hodyc D, Johnson E, Skoumalová A, Tkaczyk J, Maxová H, Vízek M a Herget J. Reactive oxygen species production in the early and later stage of chronic ventilatory hypoxia. *Physiological Research.* 2012, **61**(2), 145-151.
- Hogg DS, Davies AR, McMurray G a Kozłowski RZ. K(V)2.1 channels mediate hypoxic inhibition of I(KV) in native pulmonary arterial smooth muscle cells of the rat. *Cardiovasc Res.* 2002, **55**(2), 349-360.
- Hughes AD. Increase in tone and intracellular Ca²⁺ in rabbit isolated ear artery by platelet-derived growth factor. *Br J Pharmacol.* 1995, **114**(1), 138-142.
- Chalupsky K a Cai H. Endothelial dihydrofolate reductase: Critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005, **102**(25), 9056-9061.
- Ichiki T. [Role of Rho/Rho-kinase pathway in angiotensin II signaling]. *Nihon Rinsho.* 2002, **60**(10), 1929-1934.
- Ishikura K, Yamada N, Ito M, Ota S, Nakamura M, Isaka N a Nakano T. Beneficial Acute Effects of Rho-Kinase Inhibitor in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation Journal.* 2006, **70**(2), 174-178.
- Ito A, Shimokawa H, Nakaike R, Fukai T, Sakata M, Takayanagi T, Egashira K a Takeshita A. Role of protein kinase C-mediated pathway in the pathogenesis of coronary artery spasm in a swine model. *Circulation.* 1994, **90**(5), 2425-2431.
- Jabr RI, Toland H, Gelband CH, Wang XX a Hume JR. Prominent role of intracellular Ca²⁺ release in hypoxic vasoconstriction of canine pulmonary artery. *Br J Pharmacol.* 1997, **122**(1), 21-30.
- Jones RD, Thompson JS a Morice AH. The effect of hydrogen peroxide on hypoxia, prostaglandin F₂ alpha and potassium chloride induced contractions in isolated rat pulmonary arteries. *Pulm Pharmacol Ther.* 1997, **10**(1), 37-42.
- Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, Rosenzweig A, Salomon RN, Van Etten RA, Alroy J, Durand JB a Force T. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med.* 2006, **12**(8), 908-916.
- Khoo JP, Zhao L, Alp NJ, Bendall JK, Nicoli T, Rockett K, Wilkins MR a Channon KM. Pivotal Role for Endothelial Tetrahydrobiopterin in Pulmonary Hypertension. *Circulation.* 2005, **111**(16), 2126-2133.
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A a Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science (New York, N.Y.).* 1996, **273**(5272), 245-248.
- Klein M, Schermuly RT, Ellinghaus P, Milting H, Riedl B, Nikolova S, Pullamsetti SS, Weissmann N, Dony E, Savai R, Ghofrani HA, Grimminger F, Busch AE a Schafer S. Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling. *Circulation.* 2008, **118**(20), 2081-2090.
- Knock GA, Shaipta Y, Snetkov VA, Vowles B, Drndarski S, Ward JP a Aaronson PI. Interaction between src family kinases and rho-kinase in agonist-induced Ca²⁺-sensitization of rat pulmonary artery. *Cardiovasc Res.* 2008, **77**(3), 570-579.
- Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG a Dikalov S. Interactions of Peroxynitrite, Tetrahydrobiopterin, Ascorbic Acid, and Thiols. *Journal of Biological Chemistry.* 2003, **278**(25), 22546-22554.
- Lachmanova V, Hnilickova O, Povysilova V, Hampl V a Herget J. N-acetylcysteine inhibits hypoxic pulmonary hypertension most effectively in the initial phase of chronic hypoxia. *Life Sci.* 2005, **77**(2), 175-182.

- Leach RM, Robertson TP, Twort CH a Ward JP. Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1994, **266**(3), L223-L231.
- Li F, Xia W, Yuan S a Sun R. Acute inhibition of Rho-kinase attenuates pulmonary hypertension in patients with congenital heart disease. *Pediatric Cardiology*. 2009, **30**(3), 363-366.
- Lincoln TM, Dey N a Sellak H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol (1985)*. 2001, **91**(3), 1421-1430.
- Liu Y, Suzuki YJ, Day RM a Fanburg BL. Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin. *Circ Res*. 2004, **95**(6), 579-586.
- Madden JA, Dawson CA a Harder DR. Hypoxia-induced activation in small isolated pulmonary arteries from the cat. *J. Appl. Physiol*. 1985, **59**, 113-118.
- Madden JA, Vadula MS a Kurup VP. Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1992, **263**(3 Pt 1), L384-393.
- Maxova H, Novotna J, Vajner L, Tomasova H, Vytasek R, Vizek M, Bacakova L, Valouskova V, Eliasova T a Herget J. In vitro hypoxia increases production of matrix metalloproteinases and tryptase in isolated rat lung mast cells. *Physiol Res*. 2008, **57**(6), 903-910.
- McMurtry IF, Abe K, Ota H, Fagan KA a Oka M. Rho kinase-mediated vasoconstriction in pulmonary hypertension. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2010, **661**, 299-308.
- McMurtry IF, Bauer NR, Fagan KA, Nagaoka T, Gebb SA a Oka M. Hypoxia and Rho/Rho-kinase signaling. Lung development versus hypoxic pulmonary hypertension. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2003, **543**, 127-137.
- McMurtry IF, Davidson AB, Reeves JT a Grover RF. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonists in isolated rat lungs. *Circ Res*. 1976, **38**(2), 99-104.
- McMurtry IF, Petrun MD a Reeves JT. Lungs from chronically hypoxic rats have decreased pressor response to acute hypoxia. *Am. J. Physiol*. 1978, **235**, H104-H109.
- McNamara PJ, Murthy P, Kantores C, Teixeira L, Engelberts D, van Vliet T, Kavanagh BP a Jankov RP. Acute vasodilator effects of Rho-kinase inhibitors in neonatal rats with pulmonary hypertension unresponsive to nitric oxide. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2008, **294**(2), L205-L213.
- Moens AL, Takimoto E, Tocchetti CG, Chakir K, Bedja D, Cormaci G, Ketner EA, Majmudar M, Gabrielson K, Halushka MK, Mitchell JB, Biswal S, Channon KM, Wolin MS, Alp NJ, Paolocci N, Champion HC a Kass DA. Reversal of Cardiac Hypertrophy and Fibrosis from Pressure-Overload by Tetrahydrobiopterin: Efficacy of re-coupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy. *Circulation*. 2008, **117**(20), 2626-2636.
- Morio Y a McMurtry IF. Ca(2+) release from ryanodine-sensitive store contributes to mechanism of hypoxic vasoconstriction in rat lungs. *J Appl Physiol (1985)*. 2002, **92**(2), 527-534.
- Mouchaers KTB, Schalij I, de Boer MA, Postmus PE, van Hinsbergh VWM, van Nieuw Amerongen GP, Vonk Noordegraaf A a van der Laarse WJ. Fasudil reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: comparison with bosentan and sildenafil. *European Respiratory Journal*. 2010, **36**(4), 800-807.
- Mulvany MJ a Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*. 1977, **41**(1), 19-26.
- Murray F, Insel PA a Yuan JX. Role of O(2)-sensitive K(+) and Ca(2+) channels in the regulation of the pulmonary circulation: potential role of caveolae and implications for high altitude pulmonary edema. *Respir Physiol Neurobiol*. 2006, **151**(2-3), 192-208.

- Nagaoka T, Fagan KA, Gebb SA, Morris KG, Suzuki T, Shimokawa H, McMurtry IF a Oka M. Inhaled Rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005, **171**(5), 494-499.
- Nagaoka T, Gebb SA, Karoor V, Homma N, Morris KG, McMurtry IF a Oka M. Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in pulmonary hypertension of the fawn-hooded rat. *Journal of Applied Physiology*. 2006, **100**(3), 996-1002.
- Nagaoka T, Morio Y, Casanova N, Bauer N, Gebb S, McMurtry I a Oka M. Rho/Rho kinase signaling mediates increased basal pulmonary vascular tone in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004a, **287**(4), L665-672.
- Nagaoka T, Morio Y, Casanova N, Bauer N, Gebb S, McMurtry I a Oka M. Rho/Rho kinase signaling mediates increased basal pulmonary vascular tone in chronically hypoxic rats. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004b, **287**(4), L665-672.
- Ng LC, Kyle BD, Lennox AR, Shen XM, Hatton WJ a Hume JR. Cell culture alters Ca²⁺ entry pathways activated by store-depletion or hypoxia in canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008, **294**(1), C313-323.
- Novotná J a Herget J. Possible role of matrix metalloproteinases in reconstruction of peripheral pulmonary arteries induced by hypoxia. *Physiol Res*. 2002, **51**, 323 - 334.
- Nozik-Grayck E, Stenmark KR, Roach RC, Wagner PD a Hackett PH. Role of Reactive Oxygen Species in Chronic Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension and Vascular Remodeling Hypoxia and the Circulation. Springer US, 2007, vol. 618, 101-112.
- Oka M, Fagan KA, Jones PL a McMurtry IF. Therapeutic potential of RhoA/Rho kinase inhibitors in pulmonary hypertension. *British Journal of Pharmacology*. 2008, **155**(4), 444-454.
- Oka M, Hasunuma K, Webb SA, Stelzner TJ, Rodman DM a McMurtry IF. EDRF suppresses an unidentified vasoconstrictor mechanism in hypertensive rat lungs. *Am J Physiol*. 1993, **264**(6 Pt 1), L587-597.
- Oka M, Homma N, Taraseviciene-Stewart L, Morris KG, Kraskauskas D, Burns N, Voelkel NF a McMurtry IF. Rho Kinase-Mediated Vasoconstriction Is Important in Severe Occlusive Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *Circulation Research*. 2007, **100**(6), 923-929.
- Olschewski A, Hong Z, Peterson DA, Nelson DP, Porter VA a Weir EK. Opposite effects of redox status on membrane potential, cytosolic calcium, and tone in pulmonary arteries and ductus arteriosus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004, **286**(1), L15-22.
- Olschewski A, Li Y, Tang B, Hanze J, Eul B, Bohle RM, Wilhelm J, Morty RE, Brau ME, Weir EK, Kwapiszewska G, Klepetko W, Seeger W a Olschewski H. Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res*. 2006, **98**(8), 1072-1080.
- Pankey EA, Thammasiboon S, Lasker GF, Baber S, Lasky JA a Kadowitz PJ. Imatinib attenuates monocrotaline pulmonary hypertension and has potent vasodilator activity in pulmonary and systemic vascular beds in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013, **305**(9), H1288-1296.
- Patterson KC, Weissmann A, Ahmadi T a Farber HW. Imatinib mesylate in the treatment of refractory idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Ann Intern Med*. 2006, **145**(2), 152-153.
- Permutt S a Riley RL. Hemodynamics of Collapsible Vessels with Tone: the Vascular Waterfall. *J Appl Physiol*. 1963, **18**, 924-932.
- Platoshyn O, Brevnova EE, Burg ED, Yu Y, Remillard CV a Yuan JX. Acute hypoxia selectively inhibits KCNA5 channels in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006, **290**(3), C907-916.
- Platoshyn O, Yu Y, Ko EA, Remillard CV a Yuan JX. Heterogeneity of hypoxia-mediated decrease in I(K(V)) and increase in [Ca²⁺](cyt) in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007, **293**(2), L402-416.

- Post JM, Gelband CH a Hume JR. $[Ca^{2+}]_i$ inhibition of K^+ channels in canine pulmonary artery. Novel mechanism for hypoxia-induced membrane depolarization. *Circ Res.* 1995, **77**(1), 131-139.
- Reeves JT, Groves BM a Turkevich D. The case for treatment of selected patients with primary pulmonary hypertension. *The American Review of Respiratory Disease.* 1986, **134**(2), 342-346.
- Reeves JT a Herget J. Experimental models of pulmonary hypertension. In *Pulmonary Hypertension.* Ed. Weir Ek & Reeves JT. Futura Publ. Co., 1984, New York., pp. 361-391.
- Robertson TP, Aaronson PI a Ward JP. Hypoxic vasoconstriction and intracellular Ca^{2+} in pulmonary arteries: evidence for PKC-independent Ca^{2+} sensitization. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.* 1995, **268**(1), H301-H307-H301-H307.
- Robertson TP, Aaronson PI a Ward JP. Ca^{2+} sensitization during sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction is endothelium dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003, **284**(6), L1121-1126.
- Robertson TP, Dipp M, Ward JP, Aaronson PI a Evans AM. Inhibition of sustained hypoxic vasoconstriction by Y-27632 in isolated intrapulmonary arteries and perfused lung of the rat. *British Journal of Pharmacology.* 2000a, **131**(1), 5-9.
- Robertson TP, Hague D, Aaronson PI a Ward JP. Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat. *J Physiol.* 2000b, **525 Pt 3**, 669-680.
- Rogers TK, Steward AG a Morice AH. Effect of chronic hypoxia on rat pulmonary resistance vessels: Vasodilatation by atrial natriuretic peptide. *Clinical Science.* 1992, **83**(6), 723-729.
- Salvatera CG a Goldman WF. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol.* 1993, **264**(3 Pt 1), L323-328.
- Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P a Loirand G. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca^{2+} sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem.* 2000, **275**(28), 21722-21729.
- Savineau JP, Delafuente PG a Marthan R. Cellular mechanisms of hypoxia-induced contraction in human and rat pulmonary arteries. *Resp. Physiol.* 1995, **99**, 191-198.
- Sheehan DW, Giese EC, Gugino SF a Russel JA. Characterization and mechanisms of H_2O_2 -induced contractions of pulmonary arteries. *Am. J. Physiol.* 1993, **264**, H1542-H1547.
- Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W a Grimminger F. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest.* 2005, **115**(10), 2811-2821.
- Schwenke DO, Pearson JT, Sonobe T, Ishibashi-Ueda H, Shimouchi A, Kangawa K, Umetani K a Shirai M. Role of Rho-kinase signaling and endothelial dysfunction in modulating blood flow distribution in pulmonary hypertension. *Journal of Applied Physiology.* 2011, **110**(4), 901-908.
- Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing Z-C, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N a Souza R. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology.* 2009, **54**(1, Supplement), S43-S54.
- Smirnov SV, Beck R, Tammaro P, Ishii T a Aaronson PI. Electrophysiologically distinct smooth muscle cell subtypes in rat conduit and resistance pulmonary arteries. *J Physiol.* 2002, **538**(Pt 3), 867-878.
- Somlyo AP a Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature.* 1994, **372**(6503), 231-236.
- Somlyo AP a Somlyo AV. Ca^{2+} Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. *Physiological Reviews.* 2003, **83**(4), 1325-1358.
- Stanbrook HS, Morris KG a McMurtry IF. Prevention and reversal of hypoxic pulmonary hypertension by calcium antagonists. *Am Rev Respir Dis.* 1984, **130**(1), 81-85.

- Stenmark KR, Fagan KA a Frid MG. Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling. *Circulation Research*. 2006, **99**(7), 675-691.
- Sylvester JT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a radical view. *Circ Res*. 2001, **88**(12), 1228-1230.
- Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI a Ward JP. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev*. 2012, **92**(1), 367-520.
- Tabima DM, Frizzell S a Gladwin MT. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012, **52**(9), 1970-1986.
- Takimoto E, Champion HC, Li M, Ren S, Rodriguez ER, Tavazzi B, Lazzarino G, Paolocci N, Gabrielson KL, Wang Y a Kass DA. Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. *Journal of Clinical Investigation*. 2005, **115**(5), 1221-1231.
- Tang DD a Anfinogenova Y. Physiologic properties and regulation of the actin cytoskeleton in vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2008, **13**(2), 130-140.
- Tsai MH a Jiang MJ. Rho-kinase-mediated regulation of receptor-agonist-stimulated smooth muscle contraction. *Pflugers Arch*. 2006, **453**(2), 223-232.
- Urena J, Francoobregon A a Lopezbarneo J. Contrasting effects of hypoxia on cytosolic Ca²⁺ spikes in conduit and resistance myocytes of the rabbit pulmonary artery. *Journal of Physiology -London*. 1996, **496**, 103-109.
- Vanderpool RR, Kim AR, Molthen R a Chesler NC. Effects of acute Rho kinase inhibition on chronic hypoxia-induced changes in proximal and distal pulmonary arterial structure and function. *Journal of Applied Physiology*. 2011, **110**(1), 188-198.
- Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BSS, Karoui H, Tordo P a Pritchard KA. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998, **95**(16), 9220-9225.
- Voelkel NF, McMurtry IF a Reeves JT. Hypoxia Impairs Vasodilation in the Lung. *Journal of Clinical Investigation*. 1981, **67**(1), 238-246.
- Wang J, Shimoda LA, Weigand L, Wang W, Sun D a Sylvester JT. Acute hypoxia increases intracellular [Ca²⁺] in pulmonary arterial smooth muscle by enhancing capacitative Ca²⁺ entry. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005, **288**(6), L1059-1069.
- Wang J, Weigand L, Foxson J, Shimoda LA a Sylvester JT. Ca²⁺ signaling in hypoxic pulmonary vasoconstriction: effects of myosin light chain and Rho kinase antagonists. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007, **293**(3), L674-685.
- Wang Z, Jin N, Ganguli S, Swartz DR, Li L a Rhoades RA. Rho-kinase activation is involved in hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001, **25**(5), 628-635.
- Wang Z, Lanner MC, Jin N, Swartz D, Li L a Rhoades RA. Hypoxia inhibits myosin phosphatase in pulmonary arterial smooth muscle cells: role of Rho-kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003, **29**(4), 465-471.
- Waypa GB, Chandel NS a Schumacker PT. Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res*. 2001, **88**(12), 1259-1266.
- Weigand L, Foxson J, Wang J, Shimoda LA a Sylvester JT. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by antagonists of store-operated Ca²⁺ and nonselective cation channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005, **289**(1), L5-L13.
- Weigand L, Shimoda LA a Sylvester JT. Enhancement of myofilament calcium sensitivity by acute hypoxia in rat distal pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011, **301**(3), L380-387.
- Wilhelm J a Herget J. Role of ion fluxes in hydrogen peroxide pulmonary vasoconstriction. *Physiological Research*. 1995, **44**, 31-37.

- Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R a Kelley S. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2006, **5**(10), 835-844.
- Wilson DP, Susnjar M, Kiss E, Sutherland C a Walsh MP. Thromboxane A₂-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca²⁺ entry and Ca²⁺ sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. *Biochem J.* 2005, **389**(Pt 3), 763-774.
- Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000, **20**(6), 1430-1442.
- Xu EZ, Kantores C, Ivanovska J, Engelberts D, Kavanagh BP, McNamara PJ a Jankov RP. Rescue treatment with a Rho-kinase inhibitor normalizes right ventricular function and reverses remodeling in juvenile rats with chronic pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.* 2010, **299**(6), H1854-H1864-H1854-H1864.
- Yamagata S, Ichinose M, Sugiura H, Koarai A, Koike K a Shirato K. Effect of a calcium sensitization modulator, Y-27632, on isolated human bronchus and pulmonary artery. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.* 2000, **13**(1), 25-29.
- Yang L, Cheng D-y, Chen X-j, Su O-l a Xia X-q. [Research on Rho-kinase expression in pulmonary arterioles of rat exposed to hypoxia]. *Sichuan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Sichuan University. Medical Science Edition.* 2006, **37**(3), 395-398.
- Zhang F, Carson RC, Zhang H, Gibson G a Thomas HM, 3rd. Pulmonary artery smooth muscle cell [Ca²⁺]_i and contraction: responses to diphenyleneiodonium and hypoxia. *Am J Physiol.* 1997, **273**(3 Pt 1), L603-611.
- Ziino AJA, Ivanovska J, Belcastro R, Kantores C, Xu EZ, Lau M, McNamara PJ, Tanswell AK a Jankov RP. Effects of Rho-Kinase Inhibition on Pulmonary Hypertension, Lung Growth, and Structure in Neonatal Rats Chronically Exposed to Hypoxia. *Pediatric Research.* 2009, **67**(2), 177-182.

9. PŘÍLOHY

Publikace *in extenso*:

1. Koubsky K, Durisova J, Mikova D a Herget J. **Chronic hypoxia inhibits tetrahydrobiopterin-induced NO production in rat lungs.** *Respir Physiol Neurobiol.* 2012, **185**(3), 547-552.
2. Abe K, Toba M, Alzoubi A, Koubsky K, Ito M, Ota H, Gairhe S, Gerthoffer WT, Fagan KA, McMurtry IF a Oka M. **Tyrosine kinase inhibitors are potent acute pulmonary vasodilators in rats.** *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011, **45**(4), 804-808.



Chronic hypoxia inhibits tetrahydrobiopterin-induced NO production in rat lungs

Karel Koubský*, Jana Ďurišová, Dana Miková, Jan Herget

Department of Physiology, 2nd Medical School, Charles University, Prague, Plzeňská 130/221, 150 06 Praha 5, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 19 November 2012

Keywords:

Hypoxia

Pulmonary hypertension

NO synthase

Tetrahydrobiopterin

ABSTRACT

Tetrahydrobiopterin (BH4) is an essential cofactor for nitric oxide synthases (NOS). Oxidative stress oxidises BH4 to dihydrobiopterin (BH2), resulting in the uncoupling of the two enzymatic domains of NOS and the production of superoxide rather than NO (NOS uncoupling). Oxidative stress is known to be increased in the early stage of chronic hypoxia. This study investigated the participation of NOS uncoupling in the early phase of hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats.

Rats were exposed to 10% O₂ for 4 days. We investigated the effect of BH4 in vitro on isolated rat lungs and isolated rat peripheral pulmonary blood vessels and in vivo on exhaled NO concentration in exhaled air.

BH4 attenuated hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated lungs and its effect was reversed by L-NAME (NOS inhibitor). The main finding of the study is that the effect of BH4 was smaller in rats exposed to 4 days of hypoxia than in normoxic controls. The finding was similar in isolated pulmonary blood vessels. BH4 increased exhaled NO in both normoxic and hypoxic rats. This increase was blunted by L-NIL (specific iNOS inhibitor) and therefore attributable to iNOS.

We conclude that BH4 increased NO production in both normoxic and hypoxic rats. The increase was, however, smaller in hypoxic lungs than in controls. We assume that the smaller increase in NO production in hypoxic lungs is due to the decreased BH4/BH2 ratio in chronic hypoxia and NOS uncoupling resulting from this condition.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

NO synthases (NOS) play an important role in the regulation of pulmonary vascular tone. These enzymes produce nitric oxide from L-arginine in the presence of oxygen. All isoforms of NOS need (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH4) as a cofactor for their normal function.

With sufficient BH4 levels, electrons are transferred from the reductase domain of NOS to its oxygenase domain and then used to oxidise L-arginine to NO and L-citrulline. If BH4 levels are insufficient, the two enzymatic domains become uncoupled and the oxidation is diverted to molecular oxygen rather than L-arginine, releasing superoxide (Vásquez-Vivar et al., 1998). This is often referred to as “NOS uncoupling” and results in the generation of superoxide instead of NO.

In oxidative stress, BH4 is oxidised to 7,8-dihydrobiopterin (BH2). BH2 has no NOS cofactor function and may in addition compete with BH4 at the binding site. It appears that the BH4/BH2 ratio is more important for NOS uncoupling than the absolute BH4 level (Crabtree et al., 2009). Exogenous BH4 can be used to positively

influence the BH4/BH2 ratio, achieve NOS recoupling and increase NO production (Moens et al., 2008).

Endothelial dysfunction in terms of impaired NO production and increased release of superoxide appears to be an important pathophysiological condition in many disease states including systemic hypertension and heart failure (Takimoto et al., 2005), diabetes mellitus (Cai et al., 2005), and atherosclerosis (Antoniades et al., 2007). In this study we focus on the possible role of NOS uncoupling in hypoxia-induced pulmonary hypertension (HPH).

Multiple studies reported increased ROS production and increased markers of oxidative stress in HPH, although the sources responsible have not been fully clarified (reviewed in Nozik-Grayck et al., 2007; Tabima et al., 2012). There is also evidence that treatment with antioxidants attenuates HPH (Lachmanova et al., 2005; Lai et al., 1998). Recent results from our laboratory show that ROS production during chronic hypoxia is highest during the first days of hypoxic exposure (Hodyc et al., 2012). Although oxidative stress is generally connected with hyperoxic conditions, there is solid evidence that ROS production is increased in chronic hypoxia (Nozik-Grayck et al., 2007; Tabima et al., 2012).

We hypothesise that NOS uncoupling participates in vascular damage in HPH. The aim of our study was to test the hypothesis that during the early stage of hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats, increased ROS production oxidises BH4 to BH2, lowers the BH4/BH2 ratio, and causes NOS uncoupling.

* Corresponding author. Tel.: +420 731 213966/257 296201/257 296200; fax: +420 257 210995.

E-mail address: karel.koubsky@gmail.com (K. Koubský).

2. Methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats (250–375 g) were used for the experiments. All experiments were conducted in accordance with the European Community and US National Institutes of Health guidelines for using experimental animals. All procedures were approved by the Animal Studies Committee in the authors' institution.

2.2. Chemicals

(6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH4), N_ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), N6-(1-iminoethyl)-L-lysine (L-NIL), sodium meclofenamate, angiotensin II (ATII), sodium thiopental, pentobarbitone sodium, prostaglandin $F_{2\alpha}$ and chemical components of the solutions used for perfusion were obtained from Sigma–Aldrich Czech Republic. BH4 was dissolved in HEPES buffered saline solution (NaCl 137 mM, KCl 4.0 mM, $CaCl_2$ 1.8 mM, $MgCl_2$ 1 mM, HEPES 10 mM, glucose 10 mM; pH adjusted to 7.4 with NaOH) (Francis et al., 2010).

2.3. "In vitro" preparations

2.3.1. Isolated perfused rat lungs

Pulmonary vascular response to BH4 was studied using the isolated saline-perfused rat lung preparation as previously described (Herget and Chovanec, 2010). Rats were anaesthetised with a sodium thiopental injection (40 mg/kg body weight i.p.). The trachea was cannulated and the lungs were ventilated at 50 breaths per minute, peak inspiratory pressure 10 cm H_2O , positive end-expiratory pressure 2 cm H_2O . The inflow cannula was inserted into the pulmonary artery and the outflow cannula was inserted into the left heart ventricle. The heart-lung block was then removed from the body and positioned into a humid chamber heated to 38 °C. The lungs were perfused with saline solution with albumin (4 g/100 ml perfusate) and meclofenamate (17 μ M) at a constant flow rate (4 ml/min per 100 g body weight) using a peristaltic pump. A gas mixture of 21% O_2 , 5% CO_2 and 74% N_2 was used for ventilation and a mixture of 5% CO_2 and 95% N_2 was used to induce hypoxic challenges. The pressure in the pulmonary artery was measured via a transducer (PowerLab, AD Instruments, Spechbach, Germany). The changes in perfusion pressure corresponded to changes in pulmonary vascular resistance as the flow was kept constant.

Two groups of rats were used. The experimental group ($n=7$) was exposed to hypoxia in a hypoxic normobaric chamber with 10% O_2 for 4 days prior to the isolated perfused lung preparation. The control group ($n=8$) was kept in a normoxic environment.

2.3.1.1. Isolated perfused lung protocol. Isolated lungs were allowed a 20 min period of stabilisation. Then the reactivity to angiotensin II (ATII) (0.2 μ g in 20 μ l bolus in inflow line) was tested, followed by successive hypoxic challenges. During the challenges, the lungs were ventilated with 5% CO_2 and 95% N_2 until the maximum vasoconstriction was achieved (usually 5 min). There were 10 min intervals of normoxic ventilation between the challenges. The calculated amount of BH4 was added to the perfusate 5 min before the 3rd and 4th challenge to achieve final perfusate concentrations of 1 μ g/ml and 5 μ g/ml, respectively. After the 4th hypoxic challenge, L-NAME (50 μ M), a non-specific inhibitor of all NO synthases, was added to the perfusate. The last hypoxic challenge was performed 10 min after the administration of L-NAME (Fig. 1).

The change in perfusion pressure caused by each hypoxic challenge was evaluated as the magnitude of hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV). HPV during the second hypoxic challenge was taken as control HPV and the following HPVs were compared to it. The differences caused by BH4 and L-NAME were calculated.

2.3.2. Isolated peripheral pulmonary blood vessels

This method was used to determine the direct influence of BH4 on peripheral pulmonary vascular reactivity. The rats were anaesthetised with a pentobarbitone sodium injection (15 mg/100 g body weight i.p.). Under a dissecting microscope, peripheral pulmonary blood vessels were isolated from the left lung. The fourth or the fifth branch (average internal diameter of 0.3–0.5 mm) was used. The artery rings were mounted in an automated wire myograph (the Model 500A automated dual myograph) (Rogers et al., 1992).

Each ring was placed in a chamber filled with 10 ml of physiological salt solution, maintained at 37 °C and continuously gassed with 21% O_2 , 74% N_2 and 5% CO_2 . The vascular rings were distended automatically with wall tension that would be achieved by the resting intravascular pressure of 20 torr (as previously described for systemic vessels by Mulvany and Halpern, 1977). One hour was allowed for equilibration and vessels were normalised. Vessels were challenged with 80 mM KCl twice to induce two maximal contractions before the experiment was started. After a 20 min stabilisation period, vessels were pre-constricted with 0.1 mM prostaglandin $F_{2\alpha}$.

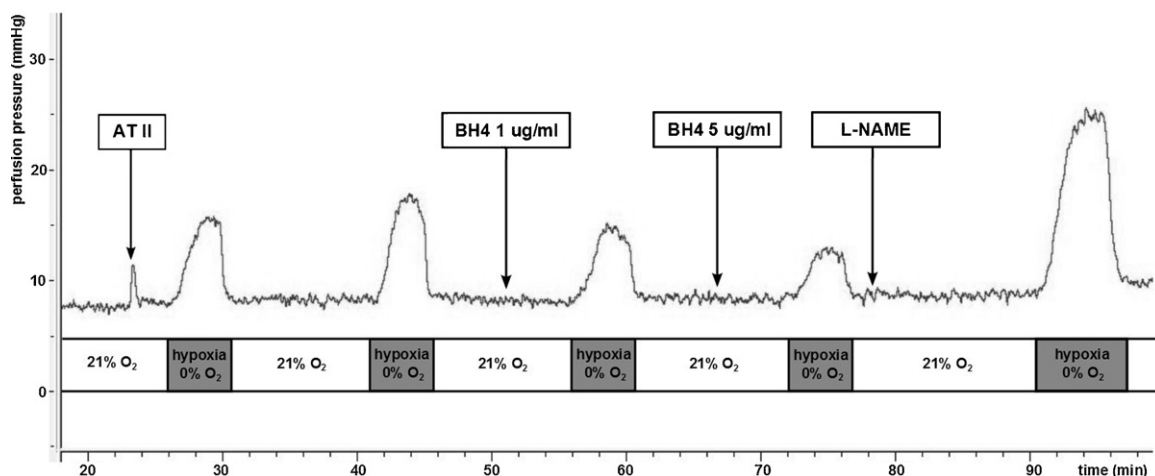


Fig. 1. Isolated rat lung experimental protocol. Original record. 21% O_2 represents ventilation with 21% O_2 + 5% CO_2 + 74% N_2 . Hypoxia 0% O_2 represents ventilation with 5% CO_2 + 95% N_2 . AT II represents an intra-arterial bolus injection of 0.2 μ g of angiotensin II. BH4 1 μ g/ml and 5 μ g/ml represent additions of BH4 to the perfusate to achieve final concentrations of 1 μ g/ml and 5 μ g/ml, respectively. L-NAME represents an addition of L-NAME to the perfusate to achieve 50 μ M concentration.

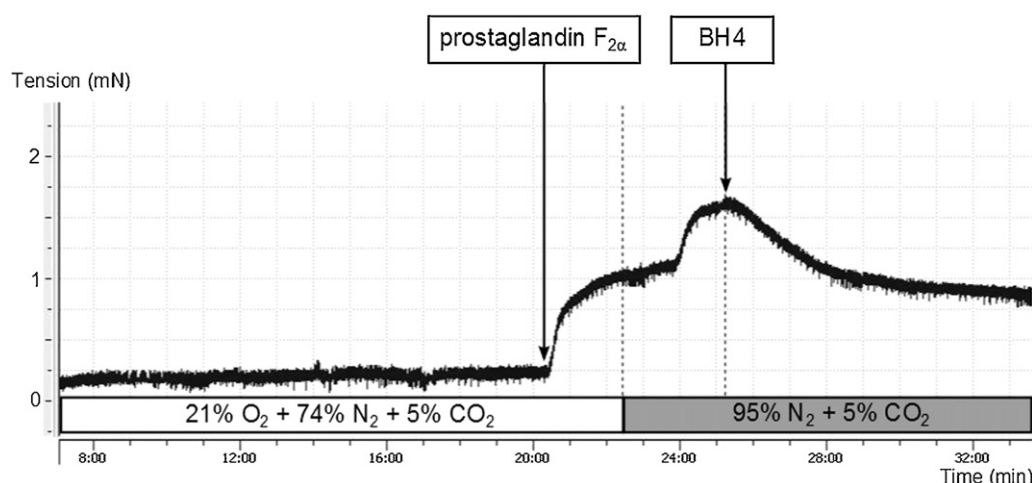


Fig. 2. Isolated peripheral pulmonary blood vessels protocol in Experiment B. Original record. 21%O₂ + 74%N₂ + 5%CO₂ and 95%N₂ + 5%CO₂ represent the mixtures of gases the chamber was gassed with. Prostaglandin F_{2α} represents an addition of prostaglandin F_{2α} (0.1 mM final concentration). BH4 represents an addition of 1 mg BH4 (100 μg/ml final concentration).

Then, after stabilisation, two experiments were performed: In experiment A we tested the effect of BH4 on acute hypoxic pulmonary vasoconstriction, in experiment B we compared the effects of BH4 on vessels isolated from normoxic and chronically hypoxic rats.

2.3.2.1. Experiment A. One group of normoxic rats was used in this experiment ($n=8$). After vasoconstriction response to prostaglandin F_{2α} reached its peak the chamber was gassed with 95% N₂ and 5% CO₂ to induce a 15 min HPV. Then after 20 min of normoxic stabilisation five similar hypoxic challenges were repeated. The calculated amount of BH4 was added to the myograph chamber perfusate 10 min before each hypoxic challenge to achieve final perfusate concentrations of 1 μg/ml, 5 μg/ml, and 20 μg/ml. L-NAME (50 μM) was added to the chamber before the last hypoxic challenge. The last HPV was performed 10 min after the administration of L-NAME.

2.3.2.2. Experiment B. Two groups of rats were used for the isolated peripheral pulmonary blood vessels preparation. One group was exposed to hypoxia in a hypoxic normobaric chamber (10% O₂) for 4 days prior to the isolated vessel preparation ($n=12$). The control group ($n=12$) was kept at room air.

When the vasoconstriction response to prostaglandin F_{2α} reached its peak the chamber was gassed with 95% N₂ and 5% CO₂ to induce similar HPV as in experiment A. At the point where the HPV reached its maximum, BH4 was added to the vessel bath (calculated to achieve 100 μg/ml final concentration) (Fig. 2). After the administration of BH4, vasodilation time was measured (the time required to decrease the original magnitude of vascular tonus by 50%).

2.4. "In vivo" measurements

2.4.1. Exhaled nitric oxide

To determine the influence of BH4 on lung NO production, NO concentration in exhaled air was measured.

One group of rats ($n=8$) was placed into a hypoxic normobaric chamber (10% O₂) (Hampl and Herget, 1990) for 4 days. The control group ($n=6$) was kept in a normoxic environment. After 4 days, NO concentration in exhaled air was measured in all animals. All animals were then given BH4 in drinking water for one day (20 mg/kg body weight/l). Afterwards, exhaled NO was measured again in all animals. All animals were then given L-NIL, a specific iNOS inhibitor,

in drinking water (8 mg/l) for one day. The final exhaled NO measurement followed.

The exhaled NO measurements were performed as previously described (Hampl et al., 2006). Each rat was placed into a 2 l glass jar flushed with NO-free air and sealed. NO that accumulated in the jar within 10 min was then measured using a chemiluminescence analyser (NOA 280i, Sievers).

2.5. Statistical analysis

All results are expressed as mean ± SEM; n represents the number of rats per group. The StatView 5.0 statistical software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for the analysis. A value of $p<0.05$ was considered statistically significant. Paired t -test or ANOVA with Scheffe's post hoc test were used for evaluation, as appropriate.

3. Results

3.1. "In vitro" preparations

3.1.1. BH4 inhibits HPV in isolated perfused rat lungs and isolated peripheral pulmonary arteries

In isolated lungs, BH4 significantly decreased HPV in the normoxic group at the higher concentration used (5 μg/ml) (Fig. 3A). In the hypoxic group, HPV was slightly decreased by BH4 but the difference was not statistically significant (Fig. 3B).

Similarly, BH4 inhibits HPV in the preparation of isolated peripheral pulmonary arteries. The inhibition by 20 μg/ml BH4 was completely reversed by L-NAME (fig. 5).

3.1.2. BH4 inhibits HPV less in chronic hypoxic lungs than in normoxic lungs

The inhibition of HPV by 5 μg/ml BH4 (the difference between HPV without BH4 and with 5 μg/ml BH4) was significantly lower in the hypoxic group than in the normoxic group (Fig. 4). There was no significant difference between the groups in the inhibition of HPV by 1 μg/ml BH4. There was also no significant difference in the absolute magnitude of HPV with L-NAME between the groups (20.5 ± 3.3 mmHg in the hypoxic group vs 15.9 ± 0.7 mmHg in the normoxic group) Fig. 5.

Vasodilation time (the time elapsed before HPV decreased to 50% of its original magnitude after the administration of BH4) in peripheral pulmonary arteries was significantly shorter in the

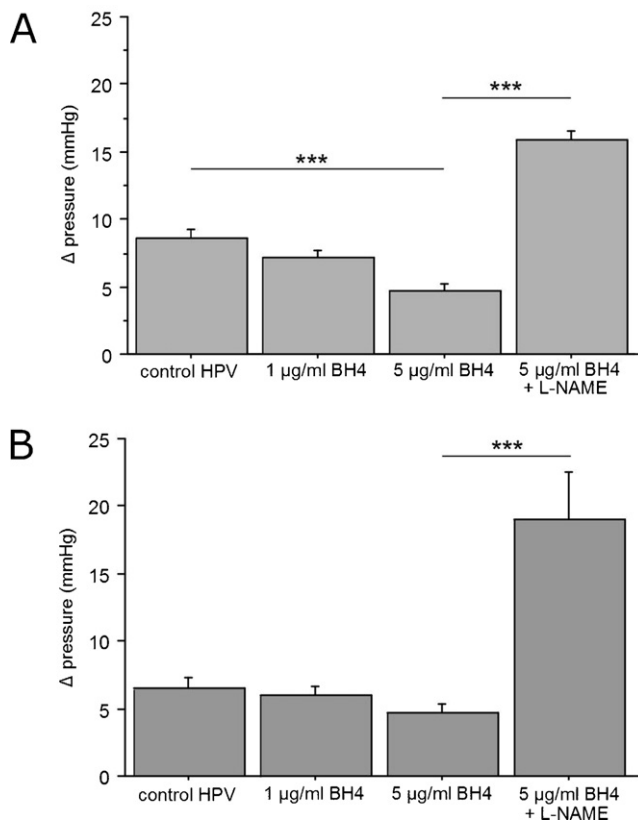


Fig. 3. HPV in isolated perfused lungs. The figure shows the perfusion pressure change caused by hypoxia (5%CO₂ + 95%N₂ ventilation) in the normoxic group (A) and in the group that spent 4 days in 10% O₂ (B). ****p* < 0.0001.

group exposed to chronic hypoxia than in the normoxic group (Fig. 6).

3.2. "In vivo" measurements

3.2.1. Chronic hypoxia increases exhaled NO concentrations

Exhaled NO concentrations were higher in hypoxic groups when compared to corresponding groups in normoxia (Fig. 7).

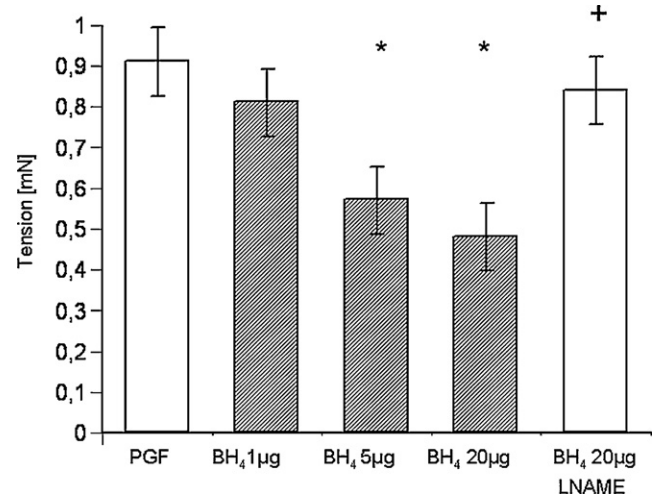


Fig. 5. HPV in isolated peripheral pulmonary blood vessels. The figure shows the tension change caused by hypoxia (5%CO₂ + 95%N₂ ventilation) in normoxic rats after addition of BH₄ solution with final perfusate concentrations of 1 μg/ml, 5 μg/ml, and 20 μg/ml and after addition of L-NAME as a non-specific inhibitor of all NO synthases. **p* < 0.05 compared to PGF, +*p* < 0.05 compared to BH₄ 20 μg/ml.

3.2.2. BH₄ increases exhaled NO concentrations

Supplementation of BH₄ increased NO concentration in exhaled air in the hypoxic and the normoxic group (Fig. 7).

3.2.3. L-NIL nearly abolishes NO release in exhaled air

L-NIL decreased NO concentration in exhaled air both in the hypoxic group and the normoxic group (Fig. 7).

4. Discussion

The main finding of the study is that the vasodilator effect of BH₄ is attenuated in rats exposed to 4 days of hypoxia compared to controls. As BH₄ is an essential cofactor for NOS, exogenous BH₄ appears to cause NOS recoupling and increase NO production (Francis et al., 2010). The increase in NO then inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction.

In isolated lungs, the amount of BH₄ that significantly inhibited HPV in the normoxic group did not produce a significant difference

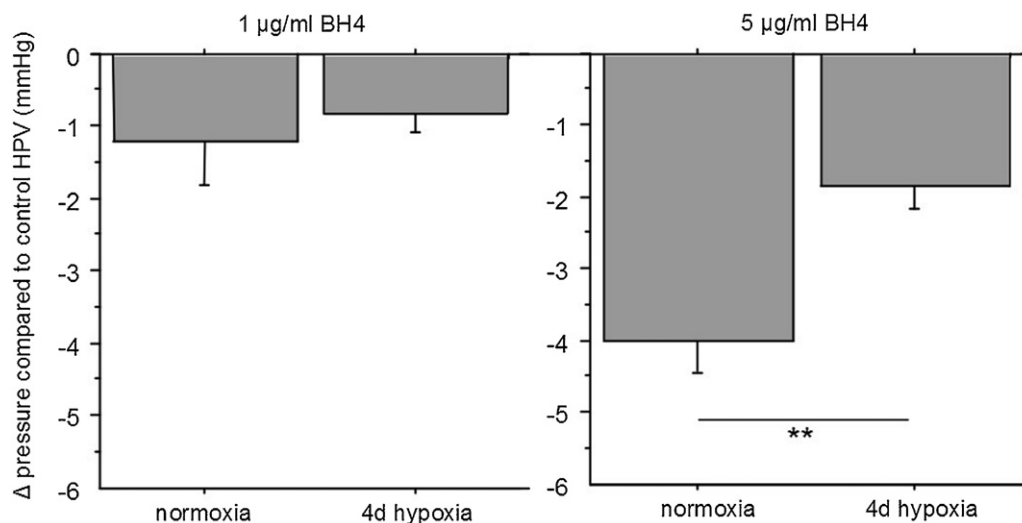


Fig. 4. Inhibition of HPV by BH₄. The figure shows the attenuation of HPV by BH₄ at 1 μg/ml and 5 μg/ml (the decrease of the pressure change caused by hypoxia with 1 μg/ml and 5 μg/ml BH₄ compared to control HPV) in both experimental groups. ***p* < 0.01.

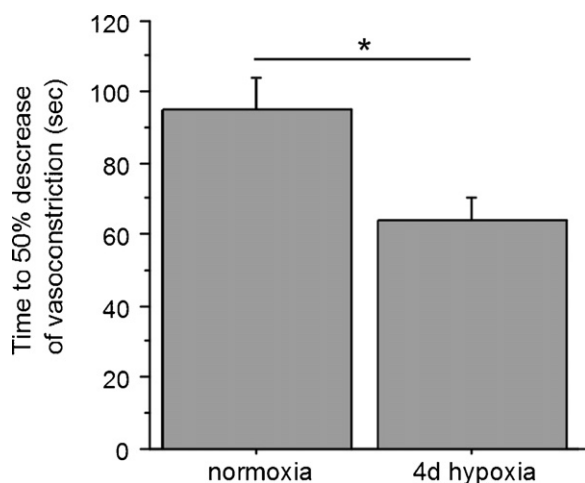


Fig. 6. Vasodilation time in isolated peripheral pulmonary blood vessels. The figure shows the time required for HPV to decrease to 50% of its original magnitude after the administration of BH4. 4d hypoxia represents a 4 day exposure to 10% O₂ prior to the vessels preparation. **p* < 0.05.

in the hypoxic group. There are several possible explanations for the attenuated effect of BH4 in hypoxic lungs. Firstly, it can be the result of the lower increase in NO production caused by BH4. Secondly, the reason can be blunted vascular reactivity to hypoxia in chronically hypoxic rats (McMurtry et al., 1978). However, we consider this explanation unlikely as the magnitude of HPV after L-NAME did not differ in normoxic and hypoxic rats (last columns in fig. 3).

We think that the most likely explanation for the lower effect of BH4 in hypoxic lungs is the lower increase in NO production. The balance between NO and superoxide produced by NOS is determined by the BH4/BH2 ratio (Crabtree et al., 2009). Exogenous BH4 increases NO production by increasing the BH4/BH2 ratio, which then influences the coupled/uncoupled state of NO synthases. When more NO synthases become coupled, NO production increases and superoxide production decreases. The finding that the same dose of BH4 added to hypoxic lungs caused a lower increase in NO production than in normoxic lungs can then be explained by a decreased BH4/BH2 ratio in hypoxic lungs. If the initial BH4/BH2 ratio is lower, the same dose of BH4 added

exogenously cannot increase the BH4/BH2 ratio to such extent as in normoxic lungs.

The major cause of decreased BH4/BH2 ratio is oxidative stress. In oxidative stress, BH4 is oxidised to BH2, therefore decreasing BH4 and increasing BH2. It has been shown that the early stage of chronic hypoxia is characterised by increased oxidative stress (Hampl et al., 2006; Herget et al., 2000; Nozik-Grayck et al., 2007). We have recently shown that ROS production is highest during the first days of hypoxia as well as NO production (Hodyc et al., 2012). It appears that BH4 is most readily oxidised by peroxynitrite, a radical produced from the reaction of superoxide with NO (Kuzkaya et al., 2003).

We assume that oxidative stress in the early stage of chronic hypoxia lowers the BH4/BH2 ratio and causes NOS uncoupling. This idea is consistent with previous findings that endothelial BH4 levels determine the susceptibility of mice to HPH (Khoo et al., 2005). Mice with BH4 overproduction were protected from HPH, whereas BH4-deficient hph-1 mice were more susceptible to it. This implies that BH4 oxidation and NOS uncoupling occurs during chronic hypoxia.

The idea that NOS uncoupling participates in the development of hypoxic pulmonary hypertension is in addition consistent with the observation that inhibition of angiotensin converting enzyme prevents the development of hypoxic pulmonary hypertension (Herget et al., 1996). It has been shown that angiotensin II causes NOS uncoupling (Chalupsky and Cai, 2005).

However, our in vivo results do not appear to support the idea of NOS uncoupling as there was no significant difference in the increase in exhaled NO caused by BH4 in hypoxic and normoxic rats. The reason for this finding can be the different role of NOS isoforms. The almost abolishing effect of L-NIL in both groups indicates that iNOS is the main source of exhaled NO. This is consistent with our previous findings (Hampl et al., 2006) and with findings in humans, where a specific iNOS inhibitor also almost blunted exhaled NO in healthy controls (Hansel et al., 2003). These results suggest that iNOS is the main source of exhaled NO in general.

On the other hand, it is likely that all isoforms of NOS were involved in NO production in our in vitro experiments (the main difference being mainly eNOS). Therefore, it is possible that the difference between normoxic and hypoxic lungs' responsiveness to BH4 is based on eNOS and that eNOS is the main NOS isoenzyme that becomes uncoupled during chronic hypoxia.

The results from our in vivo experiment also show increased NO production after 4 days of hypoxia compared to controls. This finding is typical for the early stage of chronic hypoxia and consistent with previous results from our laboratory (Hampl et al., 2006; Hodyc et al., 2012). Multiple studies have shown increased NOS activity and expression in the early stage of chronic hypoxia (reviewed in Hampl and Herget, 2000). This is not necessarily inconsistent with the idea of NOS uncoupling in HPH. Chronic hypoxia is known to stimulate both NOS activity and expression. NOS uncoupling must be understood as the percentual amount of NO synthases that are uncoupled. Even if the proportion of uncoupled NO synthases is greater in chronic hypoxia, the total NO production can still be increased compared to controls if the overall NOS expression and activity are stimulated. Additionally, our exhaled NO results show iNOS-produced NO only. We cannot determine the actual total NO production from these particular data.

We are aware of the limitations of the study. The results that suggest the role of NOS uncoupling are all indirect (inhibition of HPV by BH4). Unfortunately, we were not able to measure BH4, BH2 or the BH4/BH2 ratio directly. In addition, we did not measure ROS or the redox status of the tissues in hypoxic rats. However, we believe that these have been shown sufficiently in previous literature (Nozik-Grayck et al., 2007; Tabima et al., 2012).

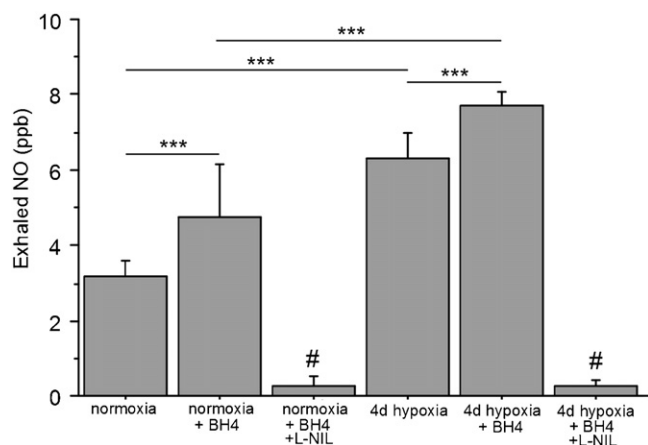


Fig. 7. Exhaled NO measurements. The figure shows NO concentration in exhaled air. 4d hypoxia represents a 4 day exposure to 10% O₂. Normoxia and 4d hypoxia represent measurements after day 4. Normoxia + BH4 and 4d hypoxia + BH4 represent measurements after day 5 (after 4 days + 1 day of BH4 treatment). Normoxia + BH4 + L-NIL and 4d hypoxia + BH4 + L-NIL represent measurements after day 6 (after 4 days + 1 day of BH4 treatment + 1 day of L-NAME treatment). ****p* < 0.0001; #*p* < 0.0001 compared to all groups without L-NIL.

Acknowledgements

This work is supported by Grant GACR 305/08/0108 and IGA MZCR NT/13358.

References

- Antoniades, C., Shirodaria, C., Crabtree, M., Rinze, R., Alp, N., Cunningham, C., Diesch, J., Tousoulis, D., Stefanadis, C., Leeson, P., Ratnatunga, C., Pillai, R., Channon, K.M., 2007. Altered plasma versus vascular biopterins in human atherosclerosis reveal relationships between endothelial nitric oxide synthase coupling, endothelial function, and inflammation. *Circulation* 116, 2851–2859.
- Cai, S., Khoo, J., Mussa, S., Alp, N.J., Channon, K.M., 2005. Endothelial nitric oxide synthase dysfunction in diabetic mice: importance of tetrahydrobiopterin in eNOS dimerisation. *Diabetologia* 48, 1933–1940.
- Chalupsky, K., Cai, H., 2005. Endothelial dihydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 9056–9061.
- Crabtree, M.J., Tatham, A.L., Al-Wakeel, Y., Warrick, N., Hale, A.B., Cai, S., Channon, K.M., Alp, N.J., 2009. Quantitative regulation of intracellular endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) coupling by both tetrahydrobiopterin-eNOS stoichiometry and biopterin redox status. *Journal of Biological Chemistry* 284, 1136–1144.
- Francis, B.N., Wilkins, M.R., Zhao, L., 2010. Tetrahydrobiopterin and the regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *European Respiratory Journal* 36, 323–330.
- Hampl, V., Bíbová, J., Banasová, A., Uhlík, J., Miková, D., Hnilicková, O., Lachmanová, V., Herget, J., 2006. Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 290, L11–L20.
- Hampl, V., Herget, J., 1990. Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *American Review of Respiratory Disease* 142, 619–624.
- Hampl, V., Herget, J., 2000. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiological Reviews* 80, 1337–1372.
- Hansel, T.T., Kharitonov, S.A., Donnelly, L.E., Erin, E.M., Currie, M.G., Moore, W.M., Manning, P.T., Recker, D.P., Barnes, P.J., 2003. A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase inhibits exhaled breath nitric oxide in healthy volunteers and asthmatics. *FASEB Journal* 17, 1298–1300.
- Herget, J., Chovanec, M., 2010. Isolated perfused murine lung: a well characterized preparation for studying lung vascular function. *Drug Discovery Today: Disease Models* 7, 131–135.
- Herget, J., Pelouch, V., Kolár, F., Ostádal, B., 1996. The inhibition of angiotensin converting enzyme attenuates the effects of chronic hypoxia on pulmonary blood vessels in the rat. *Physiological Research* 45, 221–226.
- Herget, J., Wilhelm, J., Novotná, J., Eckhardt, A., Vytásek, R., Mrázková, L., Ostádal, M., 2000. A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension. *Physiological Research* 49, 493–501.
- Hodyc, D., Johnson, E., Skoumalová, A., Tkaczyk, J., Maxová, H., Vízek, M., Herget, J., 2012. Reactive oxygen species production in the early and later stage of chronic ventilatory hypoxia. *Physiological Research* 61, 145–151.
- Khoo, J.P., Zhao, L., Alp, N.J., Bendall, J.K., Nicoli, T., Rockett, K., Wilkins, M.R., Channon, K.M., 2005. Pivotal role for endothelial tetrahydrobiopterin in pulmonary hypertension. *Circulation* 111, 2126–2133.
- Kuzkaya, N., Weissmann, N., Harrison, D.G., Dikalov, S., 2003. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols. *Journal of Biological Chemistry* 278, 22546–22554.
- Lachmanová, V., Hnilicková, O., Povysilova, V., Hampl, V., Herget, J., 2005. N-Acetylcysteine inhibits hypoxic pulmonary hypertension most effectively in the initial phase of chronic hypoxia. *Life Sciences* 77, 175–182.
- Lai, Y.L., Wu, H.D., Chen, C.F., 1998. Antioxidants attenuate chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 32, 714–720.
- McMurtry, I.F., Petrun, M.D., Reeves, J.T., 1978. Lungs from chronically hypoxic rats have decreased pressor response to acute hypoxia. *American Journal of Physiology* 235, H104–H109.
- Moen, A.L., Takimoto, E., Tocchetti, C.G., Chakir, K., Bedja, D., Cormaci, G., Ketner, E.A., Majumdar, M., Gabrielson, K., Halushka, M.K., Mitchell, J.B., Biswal, S., Channon, K.M., Wolin, M.S., Alp, N.J., Paolocci, N., Champion, H.C., Kass, D.A., 2008. Reversal of cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure-overload by tetrahydrobiopterin: efficacy of re-coupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy. *Circulation* 117, 2626–2636.
- Mulvany, M.J., Halpern, W., 1977. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research* 41, 19–26.
- Nozik-Grayck, E., Stenmark, K.R., Roach R C., Wagner, P.D., Hackett, P.H., 2007. Role of Reactive Oxygen Species in Chronic Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension and Vascular Remodeling. *Hypoxia and the Circulation*. Springer, US, pp. 101–112.
- Rogers, T.K., Steward, A.G., Morice, A.H., 1992. Effect of chronic hypoxia on rat pulmonary resistance vessels: vasodilatation by atrial natriuretic peptide. *Clinical Science* 83, 723–729.
- Tabima, D.M., Frizzell, S., Gladwin, M.T., 2012. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free Radical Biology and Medicine* 52, 1970–1986.
- Takimoto, E., Champion, H.C., Li, M., Ren, S., Rodriguez, E.R., Tavazzi, B., Lazarino, G., Paolocci, N., Gabrielson, K.L., Wang, Y., Kass, D.A., 2005. Oxidant stress from nitric oxide synthase—3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. *Journal of Clinical Investigation* 115, 1221–1231.
- Vásquez-Vivar, J., Kalyanaram, B., Martásek, P., Hogg, N., Masters, B.S.S., Karoui, H., Tordo, P., Pritchard, K.A., 1998. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9220–9225.

Tyrosine Kinase Inhibitors Are Potent Acute Pulmonary Vasodilators in Rats

Kohtaro Abe^{1,2,3,4}, Michie Toba^{1,4}, Abdallah Alzoubi^{1,4}, Karel Koubsky^{1,4}, Masako Ito^{1,4}, Hiroki Ota^{1,4}, Salina Gairhe^{1,4}, William T. Gerthoffer^{2,4}, Karen A. Fagan^{1,3,4}, Ivan F. McMurtry^{1,3,4}, and Masahiko Oka^{1,3,4}

Departments of ¹Pharmacology, ²Biochemistry and Molecular Biology, and ³Medicine, and ⁴Center for Lung Biology, University of South Alabama, Mobile, Alabama

Tyrosine kinase inhibitors are promising for the treatment of severe pulmonary hypertension. Their therapeutic effects are postulated to be due to inhibition of cell growth-related kinases and attenuation of vascular remodeling. Their potential vasodilatory activities have not been explored. Vasorelaxant effects of the tyrosine kinase inhibitors imatinib, sorafenib, and nilotinib were examined in isolated pulmonary arterial rings from normal and pulmonary hypertensive rats. Phosphorylation of myosin light chain phosphatase and myosin light chain was assessed by Western blots. Acute hemodynamic effects of imatinib were tested in the pulmonary hypertensive rats. In normal pulmonary arteries, imatinib reversed serotonin- and U46619-induced contractions in a concentration-dependent and endothelium-independent manner. Sorafenib and nilotinib relaxed U46619-induced contraction. Imatinib inhibited activation of myosin phosphatase induced by U46619 in normal pulmonary arteries. All three tyrosine kinase inhibitors concentration-dependently and completely reversed the spontaneous contraction of hypertensive pulmonary arterial rings unmasked by inhibition of nitric oxide synthase. Acute intravenous administration of imatinib reduced high right ventricular systolic pressure in pulmonary hypertensive rats, with little effect on left ventricular systolic pressure and cardiac output. We conclude that tyrosine kinase inhibitors have potent pulmonary vasodilatory activity, which could contribute to their long-term beneficial effect against pulmonary hypertension. Vascular smooth muscle relaxation mediated via activation of myosin light chain phosphatase (Ca^{2+} desensitization) appears to play a role in the imatinib-induced pulmonary vasodilation.

Keywords: tyrosine kinase inhibitors; pulmonary hypertension; vasodilation; SU5416; Ca^{2+} sensitization

Pulmonary hypertension (PH) is characterized by progressive narrowing of small pulmonary arteries and arterioles, which results in increased pulmonary vascular resistance and right ventricular pressure overload. Despite recent advances in treatment severe PH remains debilitating and fatal (1). Major factors that contribute to the complex pathogenesis of pulmonary arterial narrowing are sustained vasoconstriction and fixed vascular remodeling.

Tyrosine kinase inhibitors (TKIs), such as imatinib, nilotinib, and sorafenib, are approved for the treatment of patients with

CLINICAL RELEVANCE

Tyrosine kinase inhibitors have been reported to be promising for the treatment of severe pulmonary hypertension as antivasular remodeling agents. Nothing, however, has been considered regarding their potential vasodilatory activities. Results of this study demonstrate that tyrosine kinase inhibitors have potent pulmonary vasodilatory activity, which could contribute to their long-term beneficial effect against pulmonary hypertension.

malignant diseases (2, 3). Imatinib, an inhibitor of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), has also been reported as promising in the treatment of patients with severe PH (4). In addition, chronic treatment with imatinib or the tyrosine/serine/threonine kinase inhibitor sorafenib attenuates PH in rodent models (5–7). The therapeutic effects of these TKIs against PH are attributed to inhibition of cell growth-related factors and subsequent suppression of vascular remodeling (5, 7). It is possible, however, that TKIs also induce vascular smooth muscle cell relaxation and vasodilation because cell growth-related kinases are generally involved in cell contraction. For example, PDGFR and epidermal growth factor receptor (EGFR) are known to mediate smooth muscle cell contraction, and inhibition of these growth factor receptors induces vasodilation (8–11). In agreement with this idea, the onset of right ventricular systolic pressure lowering by chronic treatment with imatinib against established monocrotaline-induced PH was rather rapid (within 2 d) in a report by Schermuly and colleagues (7), suggesting its beneficial effects may not be explained solely by the regression of fixed vascular remodeling.

We therefore hypothesized that TKIs would have pulmonary vasodilatory activity and would effectively lower the high pulmonary vascular resistance in a rat model of severe PH. To test this hypothesis, we examined whether: (1) TKIs relaxed precontracted normotensive and hypertensive rat pulmonary arterial rings and (2) acute intravenous administration of imatinib reduced high pulmonary vascular resistance and pressure in pulmonary hypertensive rats. We used the vascular endothelial growth factor receptor blockade (by Sugeng[SU]5416) plus a hypoxia/normoxia-exposed severe PH rat model, which more closely mimics human severe PH histologically and hemodynamically than the conventional chronically hypoxic and monocrotaline-injected models (12, 13). We also examined whether imatinib-induced vasodilation involved Ca^{2+} desensitization because recent studies suggest that Ca^{2+} sensitization (smooth muscle cell contraction mediated via inhibition of myosin light chain phosphatase [MLCP]) plays an essential role in the sustained phase of various agonist-induced vascular smooth muscle contractions (14, 15) and in the sustained vasoconstriction of PH (16, 17).

(Received in original form September 10, 2010 and in final form February 17, 2011)

This work was supported by a grant from the American Heart Association (0765477Z) and by funds from the Department of Pharmacology and Center for Lung Biology, University of South Alabama.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Masahiko Oka, M.D., Ph.D., 5851 USA Drive North, MSB 3158 Mobile, AL 36688-0002. E-mail: moka@usouthal.edu

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents online at www.atsjournals.org

Am J Respir Cell Mol Biol Vol 45, pp 804–808, 2011

Originally Published in Press as DOI: 10.1165/rcmb.2010-0371OC on March 4, 2011

Internet address: www.atsjournals.org

METHODS

Animals

All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of South Alabama.

Two groups of male Sprague-Dawley rats (180–220 g) were used; one group was normal (untreated), and the other was injected subcutaneously with SU5416 (20 mg/kg) and exposed to hypoxia (10% O₂) for 3 weeks. The rats were then returned to normoxia for an additional 2 weeks (SU5416/hypoxia/normoxia-exposed PH rats) (12, 13).

Experimental Protocols

Isometric tension study. Twenty minutes after the addition of U46619 (thromboxane A₂ analog; 100 nM) or serotonin (10 μ M), concentration-response curves to imatinib (1–30 μ M) were determined in endothelium-intact and endothelium-denuded pulmonary arterial rings from normal rats. Serotonin and the thromboxane analog were used because they are involved in the pathogenesis of various experimental and human forms of PH.

Concentration-response curves to imatinib, nilotinib, and sorafenib were constructed in endothelium-intact pulmonary arterial rings from normal and SU5416/hypoxia/normoxia-exposed rats. Because imatinib caused an endothelium-independent relaxation and because our preliminary results indicate that this is also the case for the other TKI inhibitors, the following experiments were performed under nitric oxide synthase-inhibited status. All rings received 200 μ M of N^ω-nitro-L-arginine (L-NNA) after 60 minutes of equilibration. L-NNA induced marked contractions in hypertensive but not normotensive pulmonary arteries (*see* Fig. E1 in the online supplement) (18). Concentration-response curves to TKIs (0.1–100 μ M) were determined in normotensive pulmonary arterial rings precontracted by U46619 (100 nM) and in hypertensive pulmonary arterial rings precontracted by L-NNA.

Catheterized rats. Acute hemodynamic effects of imatinib were tested in anesthetized, catheterized, SU5416/hypoxia/normoxia-exposed rats. After the baseline measurements, imatinib (20 or 50 mg/kg, total volume of 0.1 ml) was injected intravenously, and hemodynamic parameters were monitored for 10 minutes (the effect of imatinib reached a plateau within 5 min). In some cases, 5 mg/kg of imatinib, which was found to have no significant hemodynamic effect, was administered at least 15 minutes before the higher dose was examined. At the end of study, the rat was killed by an overdose of pentobarbital sodium, and the heart was collected for measurement of the right ventricle/left ventricle + septum (RV/LV+S) weight ratio as an index of RV hypertrophy.

Western blot analyses. Pulmonary arterial rings from normal rats were isolated for Western blot analyses. Rings were suspended in muscle baths in the same manner as for the tension measurement experiments. After 60 minutes of equilibration, all rings were exposed to L-NNA (200 μ M) for 10 minutes. They were then given three different treatments: (1) no treatment, (2) U46619 (100 nM) alone, and (3) U46619 followed by 30 μ M imatinib. Thirty minutes after the various treatments, rings were snap frozen by immersion in a dry ice-acetone slurry containing 10% trichloroacetic acid and stored at –80°C for subsequent analyses (19).

Statistical Analysis

Values are means \pm SEM. Comparisons between groups were made with Student's *t* test, repeated measure ANOVA, or ANOVA with Scheffe's post hoc test for multiple comparisons. Differences were considered significant at *P* < 0.05.

RESULTS

Effects of Imatinib on Agonist-Induced Contractions in Pulmonary Arterial Rings

Imatinib concentration-dependently reversed serotonin-induced (Figure 1A) and U46619-induced (Figure 1B) contractions in pulmonary arterial rings isolated from normal rats. These relaxations were not reduced by endothelial removal (Figures 1A and 1B).

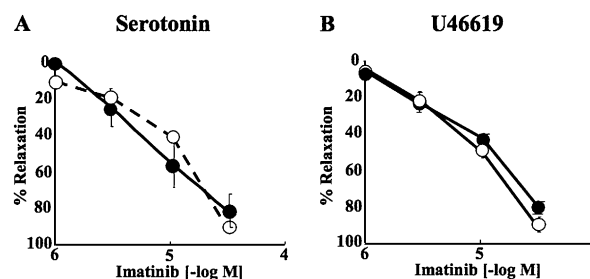


Figure 1. Concentration-relaxation curves to imatinib in endothelium-intact (closed circles) and -denuded (open circles) pulmonary arterial rings from normal rats precontracted with serotonin (A) and U46619 (B). Values are means \pm SE (*n* = 4 in each group).

Effects of Imatinib on MLCP Activity and MLC Phosphorylation

MLCP activity and MLC phosphorylation were measured as indices for Ca²⁺ sensitivity and smooth muscle contractility, respectively. In agreement with previous studies (19), U46619 increased MLCP activity (as reflected by an increase in phosphorylation of its regulatory subunit MYPT1 at Thr850) (Figure 2A) as well as the phosphorylation of MLC (Figure 2B) in pulmonary arterial rings from normal rats. Imatinib (30 μ M) significantly reduced the U46619-induced increased phosphorylation of MYPT1^{Thr850} and MLC.

Effects of Various TKIs on Contractions in Pulmonary Arterial Rings

Three different TKIs—imatinib, nilotinib, and sorafenib—reversed U46619-induced contractions in endothelium-intact pulmonary arterial rings from normal rats pretreated with L-NNA (Figure 3A). All SU5416/hypoxia/normoxia-exposed rats developed severe PH (RV/LV+S ratio, 0.64 ± 0.03 [*n* = 9] versus 0.20 ± 0.02 [*n* = 4] for control) with occlusive neointimal lesions in small pulmonary arteries and arterioles (12, 13). In contrast to no contraction by L-NNA in normotensive pulmonary arterial rings, the NOS inhibitor caused marked contraction in hypertensive rings from SU5416/hypoxia/normoxia-exposed PH rats (Figure E1), which is similar to what is observed in pulmonary arterial rings isolated from chronically hypoxic rats (18). This phenomenon can be interpreted as evidence of high spontaneous tone that is opposed by endogenously produced nitric oxide in hypertensive pulmonary arterial rings under resting tensions in physiological salt solution. In other words, L-NNA unmasks the spontaneous contraction of hypertensive pulmonary arteries. All TKIs concentration-dependently and completely reversed the spontaneous contraction in pulmonary arterial rings isolated from SU5416/hypoxia/normoxia-exposed PH rats (Figure 3B). Nilotinib and sorafenib were more potent than imatinib in reversing the U-46619-induced and the spontaneous contractions in normotensive and hypertensive pulmonary arteries, respectively.

Acute Hemodynamic Effects of Imatinib in Catheterized PH Rats

Compared with normotensive rats, SU5416/hypoxia/normoxia-exposed rats had very high RVSP (20 ± 3 versus 100 ± 5 mm Hg, respectively; *n* = 4 and 11, respectively; *P* < 0.001) with markedly reduced cardiac index (CI) (119 ± 12 versus 59 ± 8 ml/min/kg, respectively; *n* = 4 each; *P* < 0.001), normal LVSP (138 ± 9 versus 140 ± 6 mm Hg, respectively; *n* = 4 and 11, respectively; not significant [n.s.]), and HR (372 ± 23 versus 347 ± 19 mm Hg, respectively; *n* = 4 and 11; n.s.). All PH rats

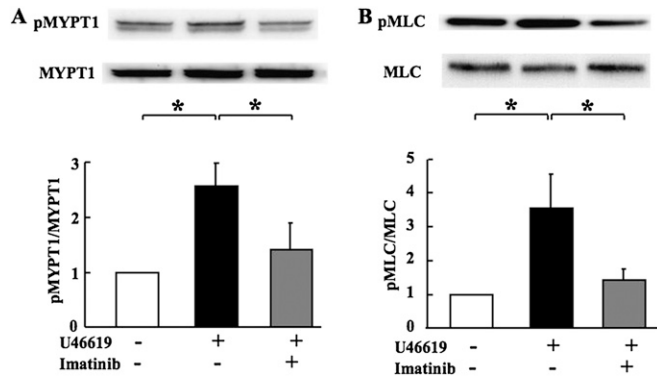


Figure 2. Effects of imatinib (30 μ M) on U46619-induced increase in phosphorylation of the regulatory subunit of (A) myosin light chain phosphatase (MYPT1) and (B) myosin light chain (MLC) in pulmonary arteries from normal rats. *Top panels* show representative immunoblots for phosphorylated (p) and total MYPT1 and MLC. *Bottom panels* show calculated densitometric ratios of pMYPT1/MYPT1 and pMLC/MLC. Values are means \pm SE ($n = 5$ –6 in each group) normalized to the ratio for controls (without U46619 and imatinib) as a value of 1. * $P < 0.05$.

showed severe RV hypertrophy as reflected by high RV/LV+S ratio compared with normal rats (0.20 ± 0.02 versus 0.55 ± 0.02 , respectively; $n = 4$ and 11, respectively; $P < 0.001$).

The acute effects of intravenous imatinib (20 and 50 mg/kg, bolus) on RVSP, LVSP, and CI were tested in anesthetized SU5416/hypoxia/normoxia-exposed severe pulmonary hypertensive rats. Imatinib (50 mg/kg) significantly lowered high RVSP (from 105 ± 7 to 87 ± 5 mm Hg; $P < 0.05$), with only minor effects on LVSP (from 140 ± 9 to 134 ± 10 mm Hg; n.s.), HR (from 367 ± 24 to 347 ± 19 mm Hg; n.s.), and CI (from 59 ± 8 to 59 ± 10 mm Hg; n.s.) (Figure 4A). Lower doses of imatinib (5 and 20 mg/kg) had no and a smaller but significant RVSP-lowering effect, respectively (Figure 4B).

DISCUSSION

This study demonstrated that the TKIs imatinib, nilotinib, and sorafenib concentration-dependently and completely relaxed precontracted normotensive and hypertensive pulmonary arterial rings from normal and SU5416/hypoxia/normoxia-exposed PH rats, respectively. Endothelium-independent vascular smooth muscle relaxation mediated via activation of MLCP (Ca^{2+} desensitization) appeared to play a role in the imatinib-induced pulmonary vasorelaxation. In addition, acute intravenous administration of imatinib effectively reduced the high RVSP without major effects on systemic arterial pressure and cardiac output in SU5416/hypoxia/normoxia-exposed rats with severe PH.

Imatinib is approved for the treatment of patients with chronic myeloid leukemia and gastrointestinal stromal tumors (2, 3). It inhibits PDGFR, c-Abelson tyrosine kinase (c-Abl), and c-kit at low concentrations (~ 1 μ M). In addition, it may inhibit other kinases, such as EGFR, Src family kinases, and protein kinase C (PKC), at higher concentrations (20, 21). Recently, chronic administration of imatinib has been reported to be promising for the clinical treatment of severe PH (4). Chronically administered high doses of imatinib (50 and 100 mg/kg) reverse the established PH induced by monocrotaline in rats and by chronic hypoxia in mice (5, 7). There are also positive clinical case reports of chronic treatment with imatinib in patients with severe PH (4, 21).

It is assumed that the beneficial effect of imatinib against PH is due to inhibition of PDGFR and the prevention of cell proliferation (5, 7). There are, however, several possible mechanisms

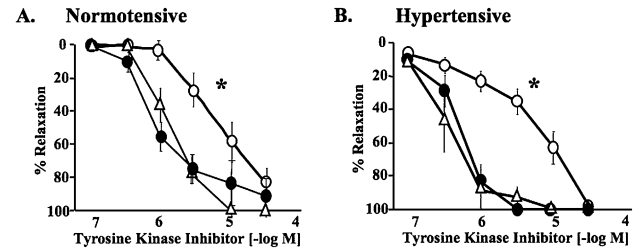


Figure 3. Concentration-relaxation curves to tyrosine kinase inhibitors, imatinib (open circles; $n = 8$), nilotinib (closed circles; $n = 4$), and sorafenib (open triangles; $n = 4$). All inhibitors showed concentration-dependent relaxations of pulmonary arterial rings from normal rats precontracted with U46619 (A) and from SU5416/hypoxia/normoxia-exposed PH rats precontracted with nitro-L-arginine (B). Values are means \pm SE. * $P < 0.001$ versus sorafenib and nilotinib.

by which imatinib could also elicit pulmonary vasodilation. These include: (1) inhibition of PDGFR-mediated elevation of intracellular Ca^{2+} levels (22); (2) inhibition of other off-target protein kinases, such as EGFR, Src, and PKC, which may regulate intracellular Ca^{2+} levels and Ca^{2+} sensitivity (8, 23, 24); and (3) inhibition of c-Abl-mediated actin polymerization (25). We found in this study that imatinib completely reversed agonist-induced contractions in isolated normal rat pulmonary arteries in an endothelium-independent manner. Consistent with previous studies in systemic arterial rings (26, 27), U46619-induced pulmonary arterial ring contraction was accompanied by increases in phosphorylation of MLC and MYPT1^{Thr850}, the regulatory subunit of MLC phosphatase (MLCP). Imatinib (30 μ M) reversed not only the contraction and the increased phosphorylation of MLC but also the increased phosphorylation of MYPT1^{Thr850}. These results suggest that imatinib is an effective endothelium-independent pulmonary vasorelaxant and that Ca^{2+} desensitization (mediated through dephosphorylation of MYPT1^{Thr850} and activation of MLCP) may contribute to its action. However, mechanisms of imatinib-induced vasodilation may be different among different arteries and mechanisms of contraction. It is also suggested that inhibition of other off-targeted kinases (e.g., EGFR, Src family kinases, and PKC), rather than simply its major targets (i.e., PDGFR, c-kit, and c-Abl), may account for the vasorelaxant activity of imatinib because the lower concentrations (1 and 3 μ M) that should be sufficient to inhibit the major targeted kinases (23) had little effect against the agonist-induced contractions.

In addition to our *in vitro* finding that a high concentration of imatinib (30 μ M) completely reversed the spontaneous contraction of hypertensive pulmonary arterial rings, we found that high doses (20 and 50 mg/kg) but not a low dose (5 mg/kg) of imatinib effectively reduced the high RVSP in SU5416/hypoxia/normoxia-exposed PH rats. The low dose (5 mg/kg) is close to the usual clinical dose for the treatment of patients with leukemia (400 mg/d) and the dose currently being used in clinical trials in patients with PH. The high dose (50 mg/kg) has been reported to be effective in the chronic treatment of pulmonary hypertensive rodent models (5, 7). In these preclinical studies, lower doses (1 and 10 mg/kg) had little or no effect in reversing the established PH. Taken together, these observations suggest that high concentrations and doses of imatinib (much higher than those effectively inhibiting the major targeted kinases) are required to exert its vasodilatory action, which may have played an important role in its chronic beneficial effect against pre-clinical models of PH. If this is the case for human PH, one can predict that a low dose (400 mg/d or ~ 5 mg/kg) of imatinib against PH in clinical trials may not be as effective as expected.

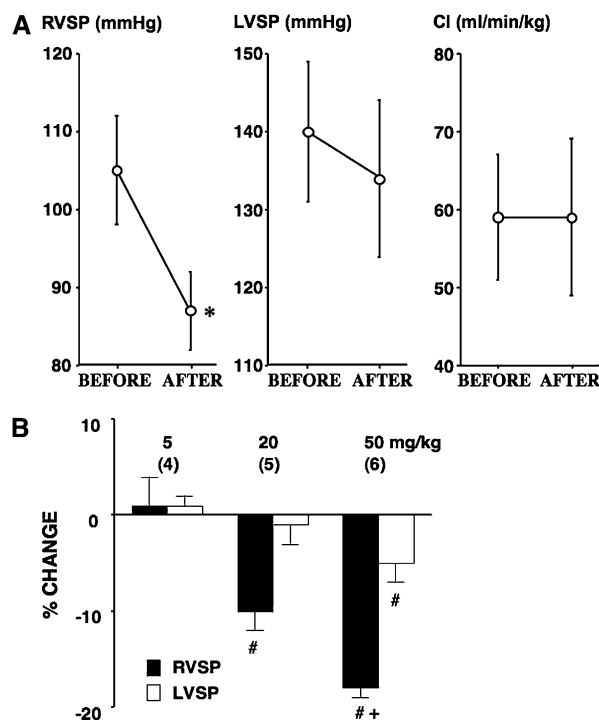


Figure 4. (A) Effects of imatinib (50 mg/kg, intravenous bolus) on right ventricular systolic pressure (RVSP) (left panel; $n = 6$), left ventricular systolic pressure (LVSP) (middle panel; $n = 6$), and cardiac index (CI) (right panel; $n = 4$) in SU5416/hypoxia/normoxia-exposed PH rats. Values are means \pm SE. * $P < 0.05$ versus BEFORE value. (B) Effects of imatinib (5, 20, and 50 mg/kg, intravenous bolus) on RVSP (closed bar) and LVSP (open bar) in SU5416/hypoxia/normoxia-exposed PH rats. Percentage change is expressed as a difference in values between baseline and after imatinib divided by each baseline value. Values are means \pm SE of $n = 6$. # $P < 0.05$ versus baseline value. + $P < 0.05$ versus 20 mg/kg. Number of rats examined is indicated in parentheses.

In fact, a very recent report demonstrates that low doses of imatinib (200 or 400 mg/d) in patients with PH failed to show significant improvement in the primary endpoint (6-min walking distance) with no significant reduction in pulmonary arterial pressure (28).

An unexpected and potentially important observation is that the blood pressure-lowering effect of imatinib in SU5416/hypoxia/normoxia-exposed severe PH rats was relatively pulmonary selective. Although it is unclear how imatinib preferentially reduced the high RVSP, one possible explanation is that it may inhibit the activity of a kinase/signaling pathway that regulates Ca^{2+} sensitivity (e.g., Src/Rho kinase pathway [24]) that is up-regulated in the hypertensive pulmonary arteries but not in the normotensive systemic arteries. Considering that clinical application of the higher doses of imatinib are unacceptable due to its potential adverse side effects (29), it may be important in future studies to identify these kinase(s) and signaling pathway(s) to develop more specifically targeted and effective therapies.

We also examined pulmonary vasorelaxant effects of two other TKIs: nilotinib, an inhibitor of PDGFR and c-Abl (30), and sorafenib, an inhibitor of PDGF and vascular endothelial growth factor receptors as well as the serine/threonine kinases Raf-1 and b-Raf (31). We found that these TKIs relaxed precontracted normotensive and hypertensive pulmonary arteries more potently than imatinib did. The relaxation by all three TKIs was apparently at least largely independent of nitric

oxide synthesis. Further studies are required to elucidate more detailed mechanisms of the relaxation. These results support our hypothesis that TKIs have a potent pulmonary vasodilatory action through inhibition of smooth muscle cell growth factor-related kinases and suggest that nilotinib and sorafenib might be more effective than imatinib in treating patients with PH.

CONCLUSION

This study demonstrated that TKIs, which are promising candidates for the treatment of severe PH as antigrowth factor and antiproliferating agents, are potent pulmonary vasodilators. This new information may be important in interpreting the chronic beneficial effects of TKIs in the clinical treatment of PH.

Author Disclosure: None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

References

- Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004;351:1425–1436.
- Cohen MH, Williams G, Johnson JR, Duan J, Gobburu J, Rahman A, Benson K, Leighton J, Kim SK, Wood R, et al. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8:935–942.
- Dagher R, Cohen M, Williams G, Rothmann M, Gobburu J, Robbie G, Rahman A, Chen G, Staten A, Griebel D, et al. Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2002;8:3034–3038.
- Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2005;353:1412–1413.
- Klein M, Schermuly RT, Ellinghaus P, Milting H, Riedl B, Nikolova S, Pullamsetti SS, Weissmann N, Dony E, Savai R, et al. Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling. *Circulation* 2008;118:2081–2090.
- Moreno-Vinasco L, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, Desai AA, Singleton PA, Sammani S, Sam L, Liu Y, Husain AN, Lang RM, et al. Genomic assessment of a multikinase inhibitor, sorafenib, in a rodent model of pulmonary hypertension. *Physiol Genomics* 2008;33:278–291.
- Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005;115:2811–2821.
- Fernandez-Patron C. Therapeutic potential of the epidermal growth factor receptor transactivation in hypertension: a convergent signaling pathway of vascular tone, oxidative stress, and hypertrophic growth downstream of vasoactive G-protein-coupled receptors? *Can J Physiol Pharmacol* 2007;85:97–104.
- Florian JA, Watts SW. Epidermal growth factor: a potent vasoconstrictor in experimental hypertension. *Am J Physiol* 1999;276:H976–H983.
- Sauro MD, Thomas B. Tyrphostin attenuates platelet-derived growth factor-induced contraction in aortic smooth muscle through inhibition of protein tyrosine kinase(s). *J Pharmacol Exp Ther* 1993;267:1119–1125.
- Berk BC, Alexander RW. Vasoactive effects of growth factors. *Biochem Pharmacol* 1989;38:219–225.
- Oka M, Homma N, Taraseviciene-Stewart L, Morris KG, Kraskauskas D, Burns N, Voelkel NF, McMurtry IF. Rho kinase-mediated vasoconstriction is important in severe occlusive pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ Res* 2007;100:923–929.
- Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mc Mahon G, Waltenberger J, Voelkel NF, Tuder RM. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J* 2001;15:427–438.
- Puetz S, Lubomirov LT, Pfitzer G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. *Physiology (Bethesda)* 2009;24:342–356.
- Somlyo AP, Somlyo AV. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin ii: modulated by g proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 2003;83:1325–1358.

16. McMurtry IF, Abe K, Ota H, Fagan KA, Oka M. Rho kinase-mediated vasoconstriction in pulmonary hypertension. *Adv Exp Med Biol* 2010; 661:299–308.
17. Oka M, Fagan KA, Jones PL, McMurtry IF. Therapeutic potential of RhoA/Rho kinase inhibitors in pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol* 2008;155:444–454.
18. Oka M, Hasunuma K, Webb SA, Stelzner TJ, Rodman DM, McMurtry IF. EDRF suppresses an unidentified vasoconstrictor mechanism in hypertensive rat lungs. *Am J Physiol* 1993;264:L587–L597.
19. Tsai MH, Jiang MJ. Rho-kinase-mediated regulation of receptor-agonist-stimulated smooth muscle contraction. *Pflugers Arch* 2006;453:223–232.
20. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2005;105: 2640–2653.
21. Patterson KC, Weissmann A, Ahmadi T, Farber HW. Imatinib mesylate in the treatment of refractory idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Ann Intern Med* 2006;145:152–153.
22. Hughes AD. Increase in tone and intracellular Ca^{2+} in rabbit isolated ear artery by platelet-derived growth factor. *Br J Pharmacol* 1995;114:138–142.
23. Ito A, Shimokawa H, Nakaike R, Fukai T, Sakata M, Takayanagi T, Egashira K, Takeshita A. Role of protein kinase C-mediated pathway in the pathogenesis of coronary artery spasm in a swine model. *Circulation* 1994;90:2425–2431.
24. Knock GA, Shaifta Y, Snetkov VA, Vowles B, Drndarski S, Ward JP, Aaronson PI. Interaction between src family kinases and Rho-kinase in agonist-induced Ca^{2+} -sensitization of rat pulmonary artery. *Cardiovasc Res* 2008;77:570–579.
25. Tang DD, Anfinogenova Y. Physiologic properties and regulation of the actin cytoskeleton in vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2008;13:130–140.
26. Neppi RL, Lubomirov LT, Momotani K, Pfitzer G, Eto M, Somlyo AV. Thromboxane A₂-induced bi-directional regulation of cerebral arterial tone. *J Biol Chem* 2009;284:6348–6360.
27. Wilson DP, Susnjak M, Kiss E, Sutherland C, Walsh MP. Thromboxane A₂-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca^{2+} entry and Ca^{2+} sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of mypt1 at thr-855, but not thr-697. *Biochem J* 2005;389:763–774.
28. Ghofrani HA, Morrell NW, Hoepfer MM, Olschewski H, Peacock AJ, Barst RJ, Shapiro S, Golpon H, Toshner M, Grimminger F, *et al.* Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182: 1171–1177.
29. Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, *et al.* Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med* 2006;12: 908–916.
30. Deremer DL, Ustun C, Natarajan K. Nilotinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Ther* 2008;30:1956–1975.
31. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:835–844.